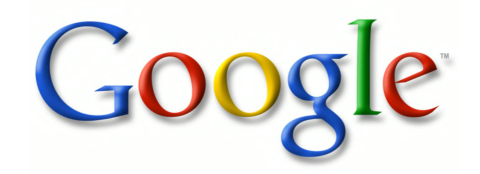
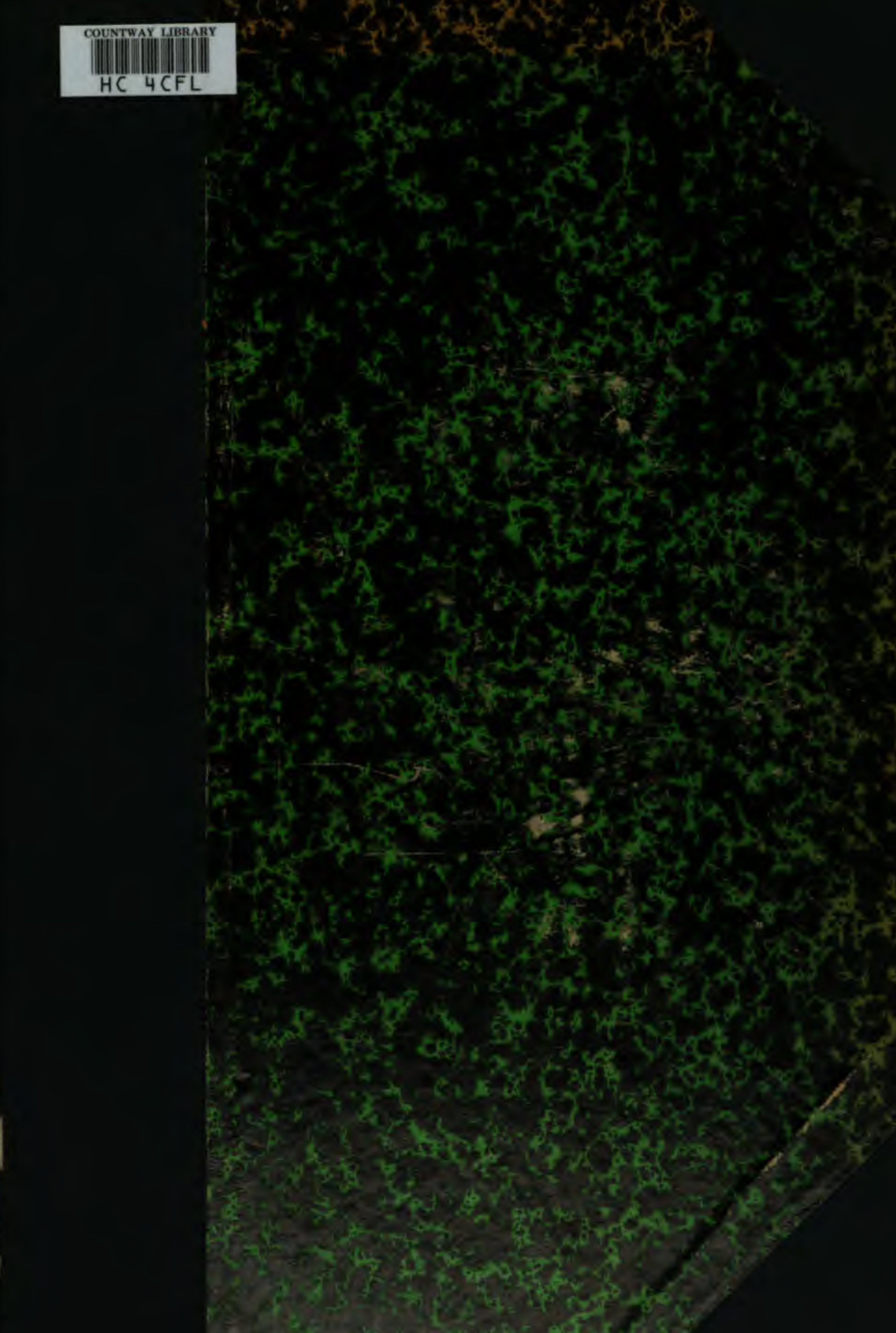
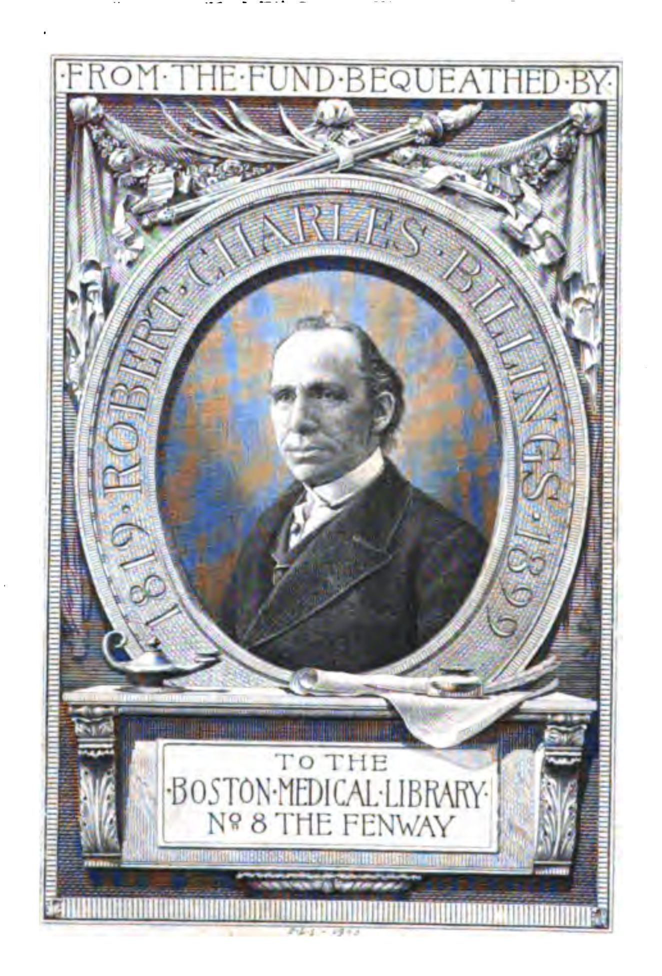
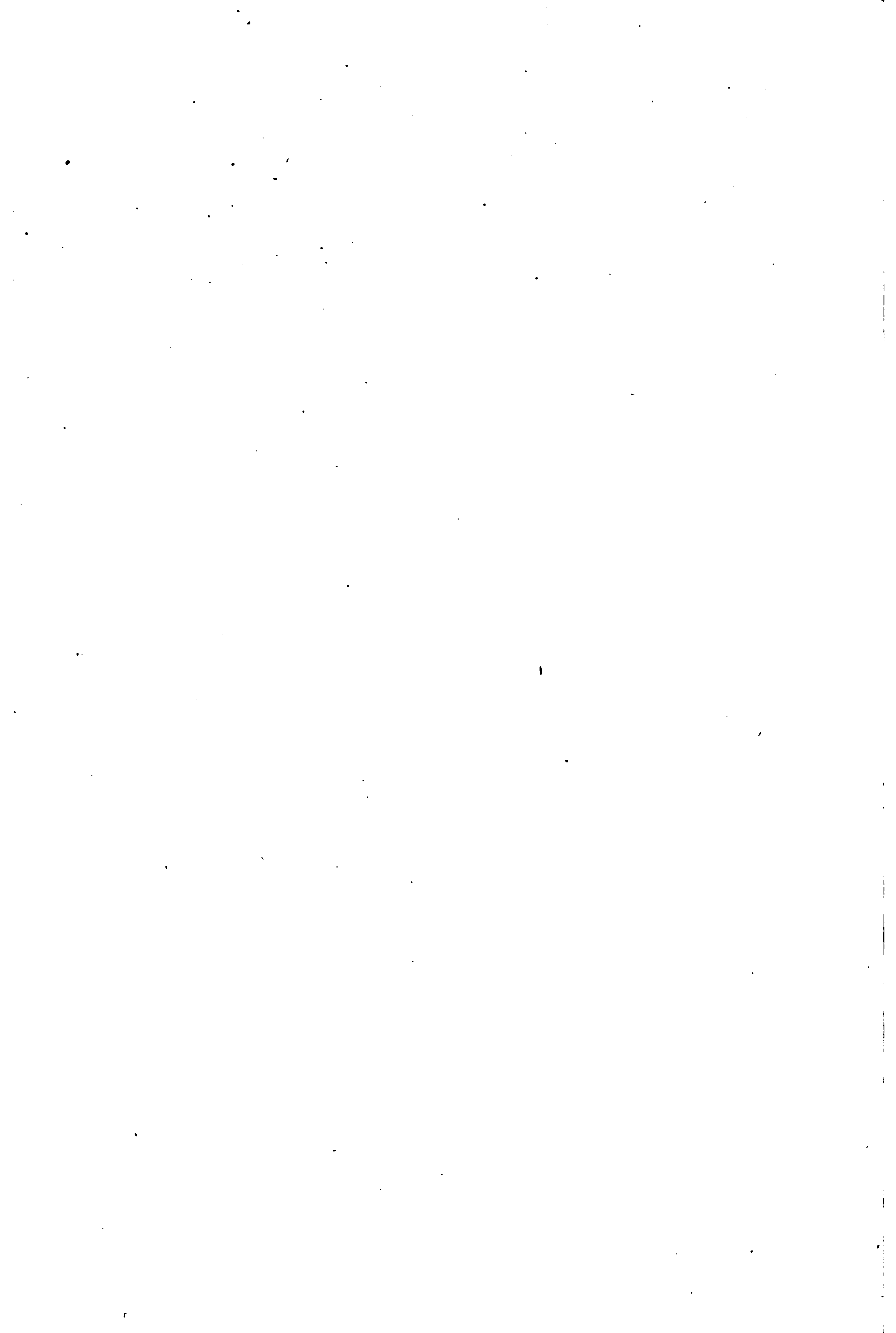



COUNTWAY LIBRARY
HC 4CFL


·FROM·THE·FUND·BEQUEATHED·BY·
1819·ROBERT·CHARLES·BILLINGS·1899
TO THE
·BOSTON·MEDICAL·LIBRARY·
Nº 8 THE FENWAY





VORLESUNGEN

ÜBER

BAKTERIENENZYME.

VON

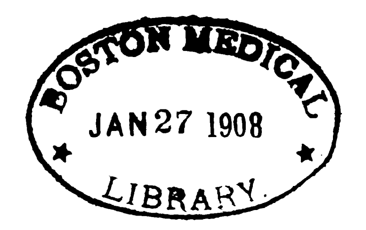
DR. PHIL. FRANZ FUHRMANN,

PRIVATDOZENTEN FÜR TECHNISCHE MYKOLOGIE AN DER TECHNISCHEN HOCHSCHULE
UND BAKTERIOLOGIE AN DER UNIVERSITÄT ZU GRAZ.

MIT 9 ABBILDUNGEN
UND 5 GRAPHISCHEN DARSTELLUNGEN IM TEXT.



JENA.
VERLAG VON GUSTAV FISCHER.
1907.



Weimar. — Druck von R. Wagner Sohn.



Vorwort.

Mit den „Vorlesungen über Bakterienenzyme" habe ich den Versuch gemacht, eine einheitliche Darstellung aller auf bakterielle Enzyme Bezug habenden Befunde zu geben. Ich war bemüht, die über dieses Forschungsgebiet bestehende Literatur zusammenzutragen, und dabei besonders diejenigen Abhandlungen hervorzuheben, die selbst wieder eine Quelle für die ältere Literatur sind. Diese Arbeit wurde dadurch wesentlich erschwert, daß sich Mitteilungen über Enzyme bei Bakterien als gelegentliche Bemerkungen in vielen Abhandlungen eingestreut finden, deren Titel davon nichts vermuten läßt. Aus diesem Grunde dürfte so manche wertvolle Angabe unberücksichtigt geblieben sein. Die Herren Autoren würden mich zu Dank verpflichten, wenn sie mir in der Abstellung dieser Mängel bei einer gelegentlichen Neubearbeitung durch Überlassung einschlägiger Sonderabdrücke behilflich sein wollten.

Dem Zwecke des Buches entsprechend, die bei Bakterien nachgewiesenen Enzyme zu behandeln, fanden nur diese eine breitere Darstellung, während andere bakterielle Umsetzungen nur nebenbei erwähnt wurden. Aus der allgemeinen Enzymlehre nahm ich nur soviel auf, als zum Verständnis unumgänglich notwendig erschien. Liegen darüber doch ausgezeichnete Monographien vor, auf die im Text verwiesen wurde. Das Gleiche gilt für die Hämolysine und die Ehrlich'sche Seitenkettentheorie. Um den Text nicht unnötig zu erweitern, sah ich von einer ausführlichen Darlegung strittiger Fragen nach Möglichkeit ab und deutete solche oft nur an. Eine eingehendere Darstellung erforderte die Versuchstechnik der bakteriellen Enzymuntersuchungen. Ich gab hauptsächlich Methoden an, die sich bei Nachuntersuchungen bewährten und die auch zum Teil neu sind.

Um das Nachschlagen und Auffinden der zahlreichen Literaturangaben zu erleichtern, fügte ich dem Buche eine Literaturzusammenstellung an, in der die Abhandlungen nach Möglichkeit mit dem vollen Titel aufgeführt worden sind. Alle jene Autoren, die mit mehreren Arbeiten

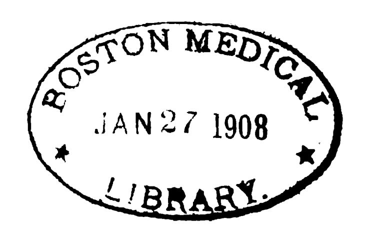
vertreten sind, wurden noch in Fußnoten im Text mit Angabe des Erscheinungsortes und der Erscheinungszeit ihrer Publikationen zitiert.

Ich übergebe die „Vorlesungen über Bakterienenzyme" der Öffentlichkeit mit dem Wunsche, daß sie einerseits dem Studierenden der Naturwissenschaften einen tieferen Einblick in dieses Wissensgebiet gewähren und anderseits dem angehenden Forscher ein Hilfsmittel bei der mühseligen Literatursuche abgeben und vielleicht manche Anregung zu weiteren Untersuchungen bieten.

Botanisches Institut
der Technischen Hochschule zu Graz,
im Juni 1907.

Franz Fuhrmann.

Inhaltsübersicht.



I.

Einleitung.

Die lebende Zelle ist der Schauplatz der verschiedenen chemischen Umsetzungen, die im allgemeinen nach zwei Richtungen erfolgen. Aus einfacheren Verbindungen erneuert das Protoplasma die beim Ablauf der Lebensprozesse entstehenden Verluste seiner eigenen Substanz. Es werden demnach aus mehr oder minder einfachen Verbindungen hochkomplexe Eiweißkörper aufgebaut, Synthesen ausgeführt. Gleichzeitig findet auch ein Abbau, eine Zerlegung von komplizierten Eiweißverbindungen und anderen Körpern innerhalb oder außerhalb der Zelle statt. Es werden also Analysen ausgeführt. Diese beziehen sich nicht nur auf Stoffe des eigenen Zellleibes, sondern auch auf die verschiedensten Körper außerhalb der Zelle. Sowohl die synthetische als auch die analytische Arbeitsleistung finden wir in jeder lebenden Zelle, sei es, daß sie einem höheren Tiere oder einer höheren Pflanze angehört, sei es, daß sie allein einen selbständigen Organismus vorstellt, wie die Vertreter des Protistenreiches. Welche der beiden Arbeitsleistungen in den einzelnen Fällen im Vordergrund steht, ist nun höchst verschieden.

Verimpft man beispielsweise Bacillus flavus(α)[1]) in eine Auflösung von weinsaurem Ammonium und Rohrzucker unter Beigabe von geringen Mengen Monokaliumphosphat, Magnesiumsulfat, Chlorcalcium und Chlornatrium, so findet eine rasche Vermehrung der eingeführten Bakterien statt. Innerhalb von 24 Stunden ist dadurch die Flüssigkeit vollständig getrübt. Die schnell ablaufenden Zellteilungen produzieren eine ungeheure Zahl von Zellen, die den eingeführten Ausgangszellen in Volumen und Größe gleich sind. Da nur einfache Verbindungen zur Ernährung zur Verfügung stehen, muß die fortwährende Plasmaneubildung aus diesen einfachen Stoffen erfolgen. Die Bakterien leisten in diesem Falle vorwiegend synthetische Arbeit. Wir finden nur unter Anwendung sehr empfindlicher chemischer Reaktionen Produkte einer gleichzeitig einhergehenden Zerlegung, die sich besonders an den mittlerweile abgestorbenen Bakterienzellen äußert. Der Rohrzucker wird nur in minimaler Menge aufgespalten.

Wesentlich anders liegen die Verhältnisse, wenn wir dieselbe Bakterienart in der in der Bakteriologie üblichen Nährgelatine züchten. Hier bieten wir den Bakterien neben einfachen Salzen eine Reihe von Eiweiß-

[1]) Eine aus Flaschenbier reingezüchtete Bakterienart.

körpern und deren nächsten Abkömmlingen als Nährstoffe. Die Nährgelatine besteht ja in einer wieder erstarrten Auflösung von Gelatine in Fleischbrühe mit einem Zusatz von Pepton und Kochsalz, mitunter auch Dextrose. Bei Zimmertemperatur vermehrt sich darauf Bacillus flavus nur sehr langsam. Erst nach einigen Tagen gewahrt man eine geringe Auflagerung. Zur gleichen Zeit macht sich aber auch eine ausgedehnte Verflüssigung der Gelatine bemerkbar. In den verflüssigten Massen können wir eine Menge verschiedenartiger einfacher Spaltungsprodukte von Eiweißkörpern feststellen. Der Leim hat sein Erstarrungsvermögen vollständig eingebüßt und ist ungefähr so verändert, als hätten stärkere Säuren oder Alkalien auf ihn in der Wärme eingewirkt. Wenn man die Menge der umgewandelten Stoffe mit der in der Zellvermehrung ausgedrückten Menge von aufgebauten Körpern vergleicht, so ist letztere gegenüber der ersteren verschwindend klein. In diesem Falle überwiegen also die spaltenden oder analytischen Arbeitsleistungen der Bazillen sehr beträchtlich die Synthesen.

Manche Wasserbakterien vermögen innerhalb von sehr kurzer Zeit große Mengen von Fibrin zu verflüssigen und tief zu zerlegen. Auf dem im fließenden Leitungswasser von ungefähr 12° C durch längere Zeit hindurch gewaschenen Fibrin pflegen sich nicht näher untersuchte Stäbchenbakterien anzusiedeln, die sich bei der genannten Temperatur nur sehr wenig vermehren und auf das Fibrin keine Wirkung äußern. Sobald man aber ein Stückchen des gewässerten Fibrins nach dem Abtrocknen in Filtrierpapier in eine sterile Petrischale gibt und bei der Temperatur von 22—35° C im Brütschrank hält, so ist das gesamte Fibrin innerhalb von 24 Stunden in eine dünnflüssige und äußerst übelriechende Masse verwandelt. Die mikroskopische Untersuchung derselben ergibt zwar die Anwesenheit zahlreicher Stäbchenbakterien, deren Menge aber doch in keinem Verhältnis zu der Menge des zerlegten Fibrins steht. Auch hier kommt man zum Schluß, daß die analytische Arbeitsleistung weitaus größer ist als die synthetische.

Um nun ähnliche Zerlegungen mit Hilfe von chemischen Reagenzien im Laboratorium auszuführen, bedarf man sehr stark eingreifender Mittel; man pflegt zu dem Ende mit starken Alkalien oder Säuren unter Druck bei hohen Temperaturen zu arbeiten. Nichts von dem steht der Bakterienzelle. zur Verfügung, ja, sie führt die genannten Synthesen und Analysen am besten dann durch, wenn die Reaktion der Stoffe neutral oder nur leicht alkalisch ist. Dabei darf die Temperatur niemals die Koagulationstemperatur des nativen Eiweißes überschreiten. Trotz der ähnlichen Endprodukte bei der Zersetzung von Eiweißkörpern durch Bakterien oder durch Säuren und Alkalien in der Hitze, obwalten dabei doch wesentlich andere Verhältnisse.

Man hat nun den Versuch gemacht, durch die Annahme einer Lebenskraft den gewaltigen Unterschied bei der Spaltung durch die Zelle und durch Säuren und Alkalien zu erklären. Damit ist natürlich nichts getan, denn die Einfügung einer neuen Unbekannten in die Gleichung von den Lebensvorgängen bringt uns in der Erkenntnis derselben um keinen Schritt weiter.

Die bedeutenden experimentellen Forschungen im verflossenen Jahrhundert auf allen Gebieten der Chemie, Physik und Physiologie haben uns einen tieferen Einblick in die Lebensvorgänge gewährt und den Weg

gewiesen, den wir wandeln müssen, wollen wir einstens das Leben als solches verstehen und erklären. Alle Vorgänge in der lebenden Zelle unterliegen allgemein gültigen Gesetzen, denen auch die anorganische Welt folgt. Seien die Prozesse in der lebenden Zelle, im Organismus noch so kompliziert, sie stellen sich als eine Summe einfacherer dar, sofern man durch das Experiment eine oder mehrere Tätigkeiten der Zelle auszuschalten vermag. So lernte man erkennen, daß eine große Anzahl der früher als gewaltige Leistungen der lebenden Zelle angestaunten Zersetzungen und Umsetzungen auch noch von bereits toten Zellen ausgeführt werden können und daß dabei das lebende Plasma als solches eigentlich gar keine Rolle mehr spielt.

Schon bevor durch die Untersuchungen von Cagniard de Latour, Schwann, Quevenne, Turpin und Mitscherlich die Grundlage zur biologischen Auffassung der Vergärung von Zucker durch Hefezellen gelegt wurde, beobachtete im Jahre 1814 Kirchhoff, daß Gerstenkeimlinge eine Substanz enthalten, die die Fähigkeit besitzt, Stärke zu verzuckern, also eine Spaltung zu bewirken. Payen und Persoz konnten aus der keimenden Gerste einen Stoff erhalten, der nach Fällung mit Alkohol als trockenes Pulver gewonnen wurde. Die wässrige Lösung dieses Pulvers besaß die Fähigkeit, Stärkekleister in Zucker zu verwandeln. Es wurde hier also eine Substanz aus lebenden Zellen gewonnen, die nach der Behandlung mit Alkohol kaum mehr einen Rest von Leben aufwies und trotzdem wieder gelöst eine Eigenschaft der lebenden Mutterzellen beibehielt, die Verzuckerung der Stärke. Man bezeichnete diese Substanz als Diastase.

Auch im Mundspeichel lernte man einen ähnlichen Stoff kennen, der Stärke in Zucker zu verwandeln vermochte. Mialhe stellte aus dem Speichel durch Fällung mit Alkohol ebenfalls ein Pulver dar, das in wässriger Lösung die Eigenschaften der Diastase aufwies.

Berthelot machte die Entdeckung, daß ein wässriger Auszug aus Hefe die Fähigkeit besaß, den Rohrzucker in zwei einfachere Zucker zu zerlegen. Die lebende Hefezelle vollführt das Gleiche. Wir haben hier wieder die Möglichkeit der Loslösung eines früher mit der Lebenstätigkeit der Zelle als unzertrennlich verbunden gedachten Vorganges von der lebenden Zelle erfüllt.

Brücke gelang es, aus der Magenschleimhaut das Pepsin darzustellen, nachdem die Wirkung desselben im Magensaft schon von Schwann richtig erkannt worden war.

Es folgten nun Entdeckungen auf Entdeckungen von Substanzen, die losgelöst von ihrer Ursprungsstätte, der lebenden Zelle, intensiv abbauende Tätigkeit entfalteten. Die dabei beobachteten Erscheinungen zeigten innige Beziehungen zu den Vorgängen bei den durch die Fäulnis hervorgerufenen Zersetzungen. Letztere klingen in vielen Erscheinungen an die längst gekannte alkoholische Gärung an. Wir finden bei den genannten Prozessen viel gemeinsames, so daß es nicht wundernehmen kann, wenn man die genannten Erscheinungen unter dem früher allerdings besser begrenzten Begriff „Fermentation“ zusammenfaßte. Früher verstand man darunter richtiger nur Prozesse, die zwar zu Zersetzungen führten, jedoch unter stürmischer Gasbildung, wie z. B. die alkoholische Gärung. Fermentationen lösten nun vor allem lebende Zellen aus, Hefen und Bakterien, die man kurzweg als Fermente bezeichnete. Als man in der Folge Stoffe

kennen lernte, die auch losgelöst von der lebenden Zelle die gleichen Vorgänge der Fermentation verursachten, wie die lebenden Zellen selbst, bezeichnete man auch diese toten Substanzen als Fermente. Zum Unterschied von den als Fermentorganismen tätigen Zellen nannte man die losgelöst von der Mutterzelle wirkenden Fermente „unorganisierte, ungeformte Fermente“ und stellte sie den „organisierten, geformten Fermenten“ gegenüber, die nur im Kontakt mit der lebenden Mutterzelle zu wirken vermögen.

Für die unorganisierten Fermente bürgerte sich mit Kühne der Name **„Enzyme“** ein, den man jetzt auch mit gutem Recht für sämtliche Fermente anwendet. Der Ausdruck „Ferment“ hat eine so vielseitige Verwendung gefunden, daß eine einheitliche Bedeutung desselben auch heute nicht vorliegt. In den modernsten wissenschaftlichen Abhandlungen findet man sehr häufig die Bezeichnung Ferment für lebende Bakterien und deren enzymatische Stoffe. Schon dies allein wäre Grund genug, die Bezeichnung Ferment zu streichen. Überdies ist aber nach unseren jetzigen Erfahrungen zwischen organisiertem Ferment und Enzym keine scharfe Grenze zu ziehen, da es sich zeigte, daß die Zahl der geformten Fermente ständig abnimmt. Was heute noch als solches gilt, ist vielleicht schon morgen als von der Zelle losgelöst wirkend erkannt. So galten seit langem die Fermente der Essiggärung und Milchsäuregärung als typische Vertreter der organisierten Fermente, bis es erst vor kurzem Buchner und Meisenheimer gelang, eine von der lebenden Zelle unabhängig wirkende Essigbakterienoxydase aus Essigbakterien als Pulver darzustellen, das in einer schwachen Äthylalkohollösung Essigbildung hervorrief. Weiter konnten in jüngster Zeit Buchner und Meisenheimer, sowie Herzog aus getöteten Milchsäurebakterien eine Substanz gewinnen, die imstande ist, beträchtliche Mengen Milchsäure aus Zucker zu bilden. Es erscheint demnach vollständig gerechtfertigt, die jede Mißdeutung ausschließende Bezeichnung „Enzym“ allgemein anzuwenden.

Bezüglich der Bezeichnung der einzelnen Enzyme sei hervorgehoben, daß es am zweckmäßigsten erscheint, zur Kennzeichnung derselben die Endung -ase anzuhängen, wie beispielsweise für das Enzym der Spaltung von Pektin Pektinase usw. Ein schätzbarer Vorschlag für die Benennung von Enzymen geht von Lippmann aus, indem er die Einführung von Doppelnamen in Anregung bringt. Diese Namen hätten zu Anfang die Bezeichnung des Ausgangsproduktes, dann die Benennung des wichtigsten Endproduktes mit der Endung -ase zu enthalten. Die so bezeichneten Enzyme haben dann die Erklärung ihrer Wirkung bereits im Namen klar ausgesprochen.

Daß für den Ablauf der Lebensvorgänge verschiedene Enzyme von der größten Bedeutung sind, kann als Tatsache gelten. Werden doch so oft Enzyme nur unter bestimmten Verhältnissen dann gebildet, oder besonders ausgiebig produziert, wenn dazu eine Notwendigkeit vorhanden ist. So regen bestimmte Nährstoffe die Bildung des für die betreffende Nahrung passenden Enzymes an. Eiweißspaltende Enzyme bilden Bakterien vorwiegend auf eiweißreichen Nährsubstraten. So sind Enzyme gerade für die Zubereitung der Nährstoffe in eine assimilierbare Form von der größten Wichtigkeit. Wie weit nun auch bei intrazellulären Vorgängen, sowohl Spaltungen als Synthesen, Enzyme eingreifen, entzieht sich vorderhand unserer Beurteilung. Jedenfalls können sie als dabei

weitgehend beteiligt gedacht werden. Es sei hier Hofmeisters Gedanke angeführt, daß sich im kolloidalen Protoplasma nebeneinander eine Reihe von selbständigen Enzymprozessen abspielen.

Trotz des innigen Zusammenhanges zwischen Enzym und Leben, kann der Lebensprozeß doch nicht mit Enzymwirkungen identifiziert werden. Damit entfällt selbstverständlich auch die Identifizierung der letzteren mit dem Stoffwechsel. Man kann sich das Verhältnis der Enzyme zum Leben etwa so denken, daß die Enzyme zwar Produkte des lebenden Protoplasmas, der lebenden Zelle sind und für den Stoffwechsel gewiß eine einschneidende Bedeutung haben, doch immerhin die Fähigkeit besitzen, nach ihrer Bildung ohne weiteres Zutun der lebenden Zelle zu wirken. Wir haben uns dementsprechend unter den Enzymen leblose Substanzen vorzustellen, einerlei ob sie während des Lebens in der Zellle zurückgehalten oder nach außen abgegeben werden. In dem Sinne können wir uns auch der Auffassung von Hofmeister anschließen, daß in der Zelle fertige vom Plasma gebildete Enzyme wirken und im Energieumsatz ausschlaggebend wirken.

In jüngster Zeit finden wir vielfach die Meinung geäußert, daß Enzyme noch einen Rest vitaler Kraft vom Plasma besitzen und sozusagen Plasmasplitter sind, die allerdings die Fähigkeit der Assimilation und Vermehrung nicht mehr haben, wohl aber noch das Gärvermögen. So steht Bokorny auf dem Standpunkt, die Buchner'sche Auffassung der Enzyme als leblose Materie nicht zu teilen, vielmehr die Enzyme in gewissem Sinne als lebende Materie zu deuten, wofür hauptsächlich die geringe Widerstandskraft derselben gegen Säuren, Alkalien, Gifte und Wärme spräche. Ob man bei Protoplasmasplittern, die die wichtigsten Kriterien des Lebens, die Vermehrung, das Wachstum und die Assimilation nicht mehr aufweisen, noch von lebender Materie sprechen kann, scheint zu mindest gewagt und der Begriff „Leben“ zu weit ausgedehnt. Überdies bringt uns die vitalistische Erklärung der Enzymvorgänge in der Erkenntnis des Begriffes Enzym nicht um Haaresbreite weiter.

II.

Wirkungsweise und Einteilung der Bakterienenzyme.

Einen wesentlichen Fortschritt in der Lehre von den Enzymen haben die Arbeiten von Ostwald und dessen Schüler Bredig gebracht. Schon Berzelius erkannte die Ähnlichkeit der Fermentwirkungen mit den Kontaktwirkungen der Katalysatoren und C. Ludwig verwies wohl zuerst auf die große Bedeutung der katalytischen Vorgänge im Organismus.

Nach Ostwalds Definition der Fermente ist das Ferment ein von einer lebenden Zelle erzeugter Stoff, der ohne in das Endprodukt der Reaktion selbst einzutreten, die Geschwindigkeit der Reaktionen vergrößert, gegebenenfalls verkleinert. Damit sind die Enzyme den Katalysatoren an die Seite gestellt und in der Tat gleichen die enzymatischen Vorgänge im allgemeinen den katalytischen. Allen katalytischen Vorgängen ist die Eigentümlichkeit gemein, daß spontan verlaufende Reaktionen durch Zutun eines als Katalysator bezeichneten Stoffes schneller verlaufen, ihre Reaktionsgeschwindigkeit also einzig und allein vergrößert wird. Dies trifft auch für die Reaktionen zu, die ohne Mithilfe eines Katalysators in unmeßbar langer Zeit ablaufen würden. Weder das Enzym noch der Katalysator sind an eines der entstehenden Endprodukte gebunden.

Hierfür bietet eine wässrige Lösung von Rohrzucker ein einfaches Beispiel. Der Rohrzucker wird in diesem Falle sowohl durch das Enzym Invertase als auch durch Säuren in ein Molekül Dextrose und ein Molekül Lävulose gespalten. Dabei können wir nach abgelaufener Spaltung die als Katalysator verwendete Säure wieder in derselben Menge wie zu Anfang nachweisen. Die Säurekatalyse wird durch Erwärmen noch beschleunigt. Genau dasselbe Resultat, die Spaltung der Saccharose in Dextrose und Lävulose erreichen wir durch Erhitzen der wässrigen Lösung ohne Katalysator. Nur die Geschwindigkeit der Reaktion ist eine bedeutend geringere, also die Reaktionszeit eine viel längere. Aber auch bei gewöhnlicher Temperatur findet die Zerlegung in Dextrose und Lävulose statt, nur dauert es noch vielmals länger. In unserem Falle beschleunigt also das Enzym Invertase oder der Katalysator Wasserstoff der zugesetzten Säure nur die Geschwindigkeit einer Reaktion, die auch spontan verläuft und dabei nur enorm lange Zeit gebraucht. In diesem Falle ist die Ähnlichkeit beider Katalysatoren deshalb noch sehr

groß, weil sowohl die Säure als auch die Invertase nichts an ihrer katalytischen Fähigkeit einbüßen, wie es für anorganische Katalysatoren meistens zutrifft und für die Invertase von Henri nachgewiesen wurde.

Nach van t'Hoff können aber nur solche Vorgänge freiwillig eintreten, bei denen Arbeit geleistet wird. Auch nur sie können deshalb enzymatisch, bezw. katalytisch beschleunigt werden. Im allgemeinen wird bei allen exothermisch verlaufenden Prozessen Arbeit geleistet, doch wurden auch endothermisch verlaufende Vorgänge bekannt, die sich unter Leistung von Arbeit abspielen. Allgemein begünstigen hohe Temperaturen das freiwillige Eintreten von endotherm niedere Temperaturen das freiwillige Eintreten von exotherm verlaufenden Vorgängen.

Damit hängt die endgültige Gleichgewichtseinstellung zusammen.

Bei allen Reaktionen, die ohne Wärmeänderungen verlaufen, erfolgt die Einstellung des Gleichgewichtszustandes nach dem Gesetze von Guldberg und Waage, ist also allein abhängig von der relativen Konzentration der einzelnen Teilverbindungen des reagierenden Gemisches. Dabei ist es einerlei, bei welcher Temperatur die Reaktion vor sich geht, denn diese kann nur auf die Geschwindigkeit der letzteren einwirken.

Sobald es sich aber um Vorgänge mit Wärmeumsetzungen handelt, wird die Temperatur, bei denen die Umsetzungen erfolgen. einen wesentlichen Einfluß auf den Endzustand ausüben. Bei gewöhnlicher Temperatur exotherm verlaufende Vorgänge, die keinen Gleichgewichtszustand erkennen lassen, können bei sehr hohen Temperaturen entgegengesetzte endotherme Reaktionen eingehen, sodaß auf diese Weise ebenfalls ein Gleichgewichtszustand hergestellt wird, der bei niederer Temperatur eben wegen des unmeßbar langsamen Verlaufes der entgegengesetzten Reaktion nicht merklich vorhanden ist. Katalytisch müssen dieselben dennoch beschleunigt werden können.

Es ist demnach eine theoretische Forderung, daß auch enzymatische Vorgänge reversibel sind, sofern die Enzyme als Katalysatoren zu gelten haben.

Nun ist es A. Croft Hill in der Tat gelungen, zuerst die Reversibilität der durch Maltase erzeugten Spaltung der Maltose darzutun, indem er zeigte, daß in genügend konzentrierten Dextroselösungen der Zusatz von Hefemaltase eine Rückbildung von Maltose bewirkt. In der Folge wurden noch eine Reihe von Umkehrungen der Enzymwirkungen bekannt. So konnte Emmerling experimentell nachweisen, daß Hefemaltase aus gesättigter Lösung von Mandelsäurenitrilglykosid und Traubenzucker Amygdalin erzeugt. Fischer und Armstrong erhielten nach Einwirkung von Kefirlaktase auf eine Lösung von Glukose und Galaktose ein Disaccharid „Isolaktose“.

Für die fettspaltenden Enzyme „Lipasen“ wurde durch die Untersuchungen von Kastle und Loewenhart, Hanriot, sowie Pottevin die Synthese eines Esters aus Fettsäure und Alkohol, bezw. von Monobutyrin aus Buttersäure und Glyzerin und endlich aus Monoleïn in Ölsäure gelöst von Trioleïn experimentell erwiesen.

Die soeben mitgeteilten Befunde erfüllen die Forderung der Reversibilität von Enzymvorgängen. Dadurch wird der Gedanke nahegelegt, daß möglicherweise die außerhalb der Zelle durch ein ausgeschiedenes Enzym gebildeten Abbauprodukte nach ihrer Diffusion in der Zelle durch

das gleiche Enzym im rückläufigen Sinne wieder aufgebaut werden. Dieser Vorgang der Synthesen in der Zelle müßte naturgemäß die Auffassung vom Zellenstoffwechsel wesentlich erweitern. Leider liegt dies vorerst nur im Bereich der Möglichkeit, denn bewiesen sind derartige reversible Vorgänge in der Zelle noch nicht.

Entsprechend den Gesetzen der Katalyse führen katalytische Vorgänge zu einem Gleichgewichtszustande, der durch den Katalysator nicht verändert werden kann, da er die dazu erforderliche Energie nicht zu liefern vermag. In unseren Fällen ist das Enzym der Katalysator. Betrachten wir uns aber enzymatische Vorgänge genauer, so finden wir, daß nur in den seltensten Fällen ein echter Gleichgewichtszustand erreicht wird. Gewöhnlich steht der Prozeß früher still. Daß es sich um keinen Gleichgewichtszustand handeln kann, geht aus dem Umstande hervor, daß eine erneute Zugabe von Enzym den Vorgang sofort wieder in Gang bringt und den Gleichgewichtszustand weiter verschiebt. Da es nun in ein und demselben Reaktionsgemisch nicht mehrere Gleichgewichte gibt, so kann der durch die Enzymwirkung rasch erreichte Endzustand gar nicht ein echtes Gleichgewicht sein. Wir haben es hier mit sogenannten „falschen Gleichgewichten“ zu tun. Dementsprechend kann nur die durch das Enzym beschleunigte Reaktionsgeschwindigkeit durch Wegfallen der Enzymwirkung wieder den dem spontanen Verlauf der Reaktion zukommenden Wert erlangen. Die Reaktion verläuft dann weiter bis zum echten Gleichgewichtszustand, doch mit einer außerordentlich kleinen Geschwindigkeit.

Das Nachlassen der Enzymwirkung vor Erreichung des wahren Endzustandes hat nun seine Ursache in einer Veränderung des Katalysators selbst oder in der Behinderung der Wirkung desselben durch die entstandenen Spaltungsprodukte.

Für diese Erklärung sprechen Tammanns Untersuchungsergebnisse. Sobald der Umsatz des Amygdalins durch das Emulsin Halt gemacht hat, genügt die Zugabe frischen Emulsins, um die Reaktion wieder weiterzutreiben. Auch die Verdünnung des Reaktionsgemisches genügt, denselben Effekt auszulösen. Das Gleiche finden wir noch bei einer Reihe anderer durch Enzyme beschleunigter Umsetzungen.

Dort, wo bei der Enzymwirkung unlösliche Produkte geschaffen werden, wie bei der Labgerinnung des Kaseins oder der Fibringerinnung werden die Einwirkungen der Reaktionsprodukte auf das Enzym in den Hintergrund treten.

Wo Enzymgemische gleichzeitig tätig sind, kann der Fall eintreten, daß durch die Tätigkeit anderer Enzyme die von einem Enzym gebildeten Reaktionsprodukte weiter zerlegt und auf diese Weise ihrer Schädlichkeit auf das ihnen zugehörige Enzym beraubt werden. So erklärt sich ungezwungen der vollständige Reaktionsverlauf, den wir bei der Bakterientätigkeit zu beobachten oft Gelegenheit haben. Wieder andere Enzyme, wie die Invertase (Invertin) erweisen sich als sehr unempfindlich gegen die entstandenen Zerlegungsprodukte.

Die Enzyme werden auch noch durch eine Reihe anderer Faktoren beeinflußt. Dafür lassen sich jedoch nur wenige allgemeine Gesetze aufstellen. Soviel steht fest, daß alle Enzyme durch stärkere Säuren und Alkalien zerstört werden. In Bezug auf die Konzentration der Säuren und Alkalien, die sichere Zerstörung hervorruft, herrschen bei den einzelnen Enzymen große Verschiedenheiten.

Neutralsalze sind im allgemeinen weniger schädlich und fällen mit anderen Körpern in entsprechenden Konzentrationen angewendet die Enzyme aus ihren Lösungen.

Protoplasmagifte, wie Chloroform, Thymol, Salizylsäure, Fluorverbindungen, Alkohol usw., scheinen für die Enzyme weniger schädlich zu sein als für die lebenden Zellen. In dieser erhöhten Widerstandsfähigkeit der genannten Stoffe fußen eben die Methoden zur Gewinnung von enzymhaltigen Präparaten aus den Zellen und zur Untersuchung der Enzymwirkungen unter Ausschluß der lebenden Zellen.

Sehr empfindlich sind die Enzyme gegen erhöhte Temperaturen. Die meisten von ihnen werden durch kurze Einwirkung von Wärmegraden über 70° C dauernd geschädigt. Dies gilt aber nur für die in Lösung befindlichen Bakterienenzyme. Als trockenes Pulver gewonnene Enzyme ertragen dagegen eine Erhitzung auf 120° C und darüber.

Starke Abkühlungen schwächen höchstens die Enzyme, vernichten sie aber nicht und behindern sie nur in ihrer Wirkung. Selbst eine Temperatur von — 190° vermag die Enzyme nicht dauernd zu schädigen. Man hat übrigens zur Gewinnung von Enzymen aus den Zellen diese bei so niedrigen Temperaturen gefrieren lassen und dann die äußerst spröde Masse rasch zertrümmert und aus den Bruchstücken der Zellen die enzymatisch wirksamen Substanzen ausgezogen.

Im allgemeinen wirkt direktes Sonnenlicht nicht sehr stark zerstörend auf Enzymlösungen, sofern man den Sauerstoff abhält, die Lösungen also mit indifferenten Gasen, wie Wasserstoff oder Kohlensäure sättigt und darin aufbewahrt. Wochenlange Einwirkung von Sonnenlicht auf Kulturfiltrate von Bakterien, die Proteasen bilden, vermindern etwas die gelatinelösende Kraft derselben. Dabei ist allerdings zu bedenken, daß die Proben in Gläsern aufbewahrt sind und daß diese die chemisch wirksamsten Strahlen jenseits des Violett absorbieren. Über die Einwirkung der ultravioletten Strahlen und der Radiumsrahlen (Henri und Mayer) auf die Bakterienenzyme ist nur wenig bekannt. Ebenso steht es mit unseren Kenntnissen über die Wirkungsweise von statischer und galvanischer Elektrizität, denn wir wissen nur, daß hochgespannte Ströme Diastase in reinster Form sehr beträchtlich schädigen. Überhaupt wirken die verschiedenen schädigenden Faktoren umso stärker, je reiner die Herstellung eines Enzympräparates gelang.

Entsprechend den Einwirkungen verschiedener Agentien auf die Enzyme hat Dastre vier Gruppen derselben aufgestellt.

1. Agentien, die nicht aktive Vorstufen von Enzymen wirksam machen: zymoplastische Momente.

2. Agentien, die die Wirkung der Enzyme fördern, wie sehr verdünnte Säuren oder Alkalien, oder für Lab Kohlensäure und endlich sozusagen für alle Enzyme eine bestimmte Erwärmung: zymoexzitierende Agentien.

3. Alle Einwirkungen, die die Enzymwirkungen entweder schwächen oder aber vorübergehend aufheben, wie Kälte: erstere bezeichnete Arthus als Zymofrénateurs, letztere als Zyminhibiteurs.

4. Diejenigen Einflüsse, die die Enzymwirkung vollends zerstören, wie hohe Temperaturen und sehr konzentrierte Säuren oder Gifte usw.: Zymolyse.

Bisher können wir kein Merkmal der Enzyme herausheben, das eine Einreihung derselben unter die Katalysatoren verbietet. Auch bei den anorganischen Katalysatoren finden wir vollständig analoge Fälle.

Ostwald verlangt für die Katalysatoren die schon von Berzelius erkannte Kontaktwirkung, also in jeder Phase der Katalyse die Freiheit des Katalysators. Wir kennen aber eine Reihe von Vorgängen, bei denen der Katalysator selbst in den Prozeß eintritt, wodurch Zwischenreaktionen auftreten. Es sei an die Bildung von Äther aus Alkohol unter Schwefelsäurezusatz erinnert, wobei als intermediäres Produkt Äthylschwefelsäure entsteht. Nach diesem Modus verlaufende Vorgänge werden durch Pseudokatalysatoren eingeleitet. Außerdem sind noch jene Fälle zu berücksichtigen, bei denen der Katalysator dadurch Reaktionen beschleunigt, daß sich in ihm die reagierenden Stoffe lösen.

Für die Enzymwirkungen kann höchstwahrscheinlich eine vorläufige Bindung des Enzymes an das betreffende Substrat angenommen werden. Durch den Zerfall findet dann wieder eine Befreiung des Enzymes statt, worauf es neuerlich in Tätigkeit treten kann. Dafür spricht einmal der Umstand, daß Enzyme im Verein mit den für sie zugänglichen Stoffen widerstandsfähiger sind als allein, und dann die Bindungsfähigkeit gewisser Enzyme an Fibrin.

Außerdem muß hier auch noch die Spezifizität der Enzyme erwähnt werden, die ebenfalls für die Annahme einer vorübergehenden Bindung an das zu spaltende oder anzugreifende Substrat verwendet werden kann.

Durch die Untersuchungen Emil Fischers über die Glukosidspaltung durch Enzyme gelangten wir zu einer Erklärung der schon früher bekannten spezifischen Eigenschaften der Enzyme. Man wußte ja, daß für die verschiedenen der enzymatischen Spaltung unterliegenden Verbindungen bestimmte Enzyme vorhanden sind. Emil Fischer konnte nun experimentell feststellen, daß z. B. das α-Methylglukosid durch Invertin gespalten wird, während das β-Methylglukosid davon unbeeinflußt bleibt und nur vom Emulsin zerlegt wird, das aber α-Methylglukosid nicht angreift. Es handelt sich um gleiche chemische Verbindungen, die sich nur durch die Lagerung des asymmetrischen Kohlenstoffatoms unterscheiden, also nur eine andere sterische Konfiguration besitzen. Fischer dehnte seine Untersuchungen auch auf andere enzymatische Spaltungen aus und aus den Ergebnissen dieser schönen Arbeiten kann man den allgemeinen Schluß ziehen, daß ein Enzym nur diejenigen Verbindungen zu spalten vermag, die mit dem betreffenden Enzym ein gleich gelagertes Atom besitzen. Die übrige Zusammensetzung derselben scheint belanglos zu sein. Demnach kann ein Enzym auch mehrere verschiedene Verbindungen angreifen, sofern dieselben nur das für das Enzym passend sterisch gelagerte Atom besitzen, womit aber die Spezifizität der Enzyme vollständig gewahrt bleibt. Diese Anpassung zwischen der Konfiguration der zu spaltenden Substanz und dem Enzym deutet aber ebenfalls auf eine vorübergehende Bindung desselben.

Bis heute ist es nicht gelungen, ein Enzym rein als chemisches Individuum darzustellen, obwohl die mühevollsten Untersuchungen darüber angestellt wurden. Allem Anscheine nach handelt es sich bei den meisten Enzymen um eiweißähnliche oder eiweißartige Stoffe, während beispielsweise die Reinigung des Pepsins und

des Invertins soweit gebracht wurde, daß die davon hergestellten Lösungen keine Eiweißreaktionen mehr gaben. Trotzdem waren sie noch sehr gut wirksam. In jüngster Zeit berichten Siegmund Fränkel und Max Hamburger über eine Reindiastase, die im trockenen Zustand ein lichtgelbes, in Alkohol vollständig unlösliches und in Wasser leichtlösliches Pulver darstellt. Die wässrige Lösung derselben gab weder die Biureoreaktion noch die Xanthoproteinreaktion und wies beim Kochen mit alkalischer Bleilösung keine Schwarzfärbung auf. Auch die Millon'sche Reaktion trat nur spurweise ein.

Bei dem Versuche, die Aktivität der Enzyme auf das Vorhandensein kinetisch labiler Atomgruppen zurückzuführen, kommt Oskar Loew zur Annahme von Keton- und Amidogruppen in den Enzymen und sucht dies damit experimentell festzustellen, daß er Verbindungen zusetzte, die mit den Keton- und Amidogruppen sofort reagieren. Dadurch wurde in der Tat die Enzymwirkung empfindlich geschädigt. Formaldehyd soll ebenfalls wegen seiner Reaktion mit Amidogruppen deletär auf Enzyme einwirken. Mehr läßt sich zur Zeit über die chemische Natur der Enzyme nicht mit Sicherheit aussagen.

Im Laufe der letzten Jahrzehnte wurde eine Reihe von Bakterienenzymen bekannt, die die verschiedenartigsten Zersetzungen hervorrufen. Auch für die Bakterienenzyme gelten selbstverständlich die allgemeinen Gesetze der Enzymwirkungen. Nur ist es bei den einzelligen Organismen schwer, die einzelnen Enzymwirkungen zu untersuchen. Gerade einzellige Wesen sind auf die gleichzeitige Tätigkeit vieler Enzyme angewiesen. Immerhin wurden auch auf diesem Gebiete nennenswerte Erkenntnisse gesammelt.

Am weitesten sind bei den Bakterien Enzyme verbreitet, die Spaltungen im Sinne Hugo Fischers beschleunigen. Diese Spaltungen führen zu Produkten, die im hochkomplexen Ausgangsmateriale bereits enthalten sind, „bei denen ein Körper höherer Zusammensetzung in seine Komponenten, in die in seinem Moleküle bereits enthaltenen Atomgruppen zerlegt wird". Damit ist eine engere Umgrenzung einer Reihe von wesentlich gleichartig verlaufenden Vorgängen gegeben, die von den Zersetzungen bei der Oxydation oder von den Umsetzungen bei der alkoholischen Gärung grundverschieden sind. Bei letzterer findet keine einfache Zerlegung in bereits vorhandene Atomgruppen statt, sondern eine Umlagerung von Sauerstoff innerhalb der Verbindung, eine innere Oxydation, bei der kein Sauerstoff von außen aufgenommen wird. Es wird vielmehr der durch die Reduktion eines Teiles des Moleküls freiwerdende Sauerstoff zur Erreichung der höchsten Oxydationsstufe des anderen Teiles des Moleküls verwendet. Durch die Anhäufung des Sauerstoffes an einer Stelle des Zuckermoleküls wird der Zerfall desselben herbeigeführt.

Die Spaltungen vermittelnden Enzyme der Bakterien richten ihre Wirkung gegen verschiedene komplexe Verbindungen, wie Kohlenhydrate, Glukoside, Fette und Eiweißkörper. Im allgemeinen geschieht die Spaltung unter Wasseraufnahme, ist also hydrolytischer Natur und läßt sich dort, wo die Konstitution des Ausgangsmateriales bekannt ist, im wesentlichen durch einfache Formeln wiedergeben. Ob aber die enzymatische Spaltung in allen Phasen diesen Formeln folgt, muß dahingestellt bleiben.

Der von Berthelot als enzymatischer Prozeß erkannte Abbau des Disaccharides Rohrzucker durch Invertin verläuft anscheinend einfach nach der Formel

$$C_{12}H_{22}O_{11} + H_2O = C_6H_{12}O_6 + C_6H_{12}O_6$$

wobei 1 Molekül Dextrose und 1 Molekül Lävulose entstehen.

Milchzucker wird durch das entsprechende Enzym „Laktase" in d-Glukose und d-Galaktose gespalten.

Maltose zerfällt durch das Enzym „Maltase" in zwei Moleküle Glukose.

Wieder andere Enzyme spalten die Polysaccharide. Man faßt diese Enzyme auch als „Diastasen" oder besser „Amylasen" zusammen. Unter ihrer Einwirkung entsteht beispielsweise aus Stärke Maltose und Dextrin.

Glukoside unterliegen ebenfalls einer enzymatischen Spaltung. Das von Robiquet und Boutron-Chalard entdeckte und zuerst aus Bittermandelkernen dargestellte Amygdalin wird durch das ebendort vorkommende Emulsin (Synaptase) in Traubenzucker, Benzaldehyd und Blausäure gespalten.

Bei den Bakterien trifft man fettspaltende Enzyme „Lipasen". Diese veranlassen eine Spaltung der Fette in Glyzerin und in freie Fettsäuren.

Viel komplizierter liegen die Verhältnisse bei der Spaltung der Eiweißkörper durch die verschiedenen proteolytischen oder eiweißspaltenden Bakterienenzyme. Da wir den Bau des Eiweißmoleküls noch nicht kennen, müssen wir uns damit begnügen, aus den auftretenden Spaltungsprodukten auf die Tätigkeit dieser Enzyme Rückschlüsse zu ziehen. Ein genauerer Einblick in die Vorgänge selbst ist uns jetzt noch versagt. Das im Reich der Bakterien kaum mit Sicherheit nachgewiesene Pepsin spaltet die Eiweißkörper bei kurzer Einwirkungsdauer nur in Albumosen und Peptone. Nach längerer Einwirkung wird auch eine tiefergehende Zerlegung eingeleitet. Höchstwahrscheinlich kann man dafür in jeder Bakterienzelle tryptische Enzyme nachweisen. Diese führen sehr tiefgehende Spaltungen der Eiweißkörper durch, so daß daraus Amino- und Diaminosäuren resultieren.

Eine große Ähnlichkeit mit den proteolytischen Enzymen besitzen die zelllösenden Enzyme. Es wurden zahlreiche Bakterien bekannt, die Substanzen in das Kulturmedium abgeben, welche Blutkörperchen zu lösen vermögen. Solche Stoffe bilden unter anderen Staphylokokken, dann der Erreger des Wundstarrkrampfes, der Bacillus tetani, dann Diphtheriebazillen u. a. m. Die meist untersuchtesten sind das Styphylolysin von Staphylokokken und des Tetanolysin der Tetanusbazillen. Diese Hämolysine lösen die roten Blutzellen nicht im vollen Sinne des Wortes, sondern bringen nur Veränderungen derselben hervor, deren Folge ein Austritt des Hämoglobins aus der Zelle ist. Übrigens bilden noch viele andere Bakterien Lysine für Bakterienzellen, ja sogar für die eigenen Zellen, nachdem in alten Kulturen stets eine Auflösung von Zellen zu beobachten ist. Bei diesen Vorgängen, die meistens als autolytisch aufgefaßt werden, drängt sich doch der Gedanke auf, daß vielleicht von lebenden Zellen abgesonderte tryptische Enzyme einfach die Eiweißkörper der bereits abgestorbenen Zellen lösen, während die lebenden

Zellen selbstverständlich von denselben nicht beeinflußt werden. Im allgemeinen vermögen proteolytische Enzyme überhaupt lebende Zellen, lebendes Eiweiß nur sehr schwierig anzugreifen.

Den proteolytischen Enzymen schließen sich unmittelbar auch die koagulierenden Enzyme an, wie Lab oder Chymosin. Die Untersuchungen von Hammarsten lehren uns, daß durch das Labenzym das Kasein eine Modifikation erfährt, indem es in Parakasein übergeführt wird. Die Fällung des Parakaseins ist erst ein sekundärer Vorgang, der mit der Labwirkung als solcher eigentlich nichts zu tun hat. Im allgemeinen bezeichnet man die koagulierenden Enzyme als Koagulasen.

Die bisher genannten abbauenden Enzyme vereinigt Hugo Fischer zutreffend zu einer Klasse von Enzymen, die er als Schizasen bezeichnet. Sie unterscheiden sich auch wesentlich von den bekannten übrigen Enzymen.

Bei den Bakterien finden sich auch oxydierende Enzyme, die allerdings der Trennung von der Zelle große Schwierigkeiten bereiteten. Sie wirken im wesentlichen in der Weise, daß sie durch Spaltung des molekularen Sauerstoffes diesen aktivieren. Bevor es gelang, ein oxydierendes Enzym, eine Oxydase von der Bakterienzelle losgelöst wirksam zu erhalten, hat Yoshida bereits aus dem Safte des Lackbaumes eine Oxydase gewonnen, die Bertrand als Lakkase bezeichnete. Erst vor wenigen Jahren konnten Buchner und Meisenheimer aus getöteten Essigbakterien eine Oxydase gewinnen, nachdem man lange Zeit gerade die Essigbakterien als typische Vertreter der geformten Fermente ansah. Die Essigspaltung aus Aethylalkohol ist eine reine Oxydation über das Zwischenprodukt Aldehyd.

Bei zahlreichen Bakterien vermutet man Enzyme, die das Peroxyd des Wasserstoffes reduzieren, die Katalasen. Bei diesem Vorgang dürfte das Wasserstoffperoxyd nach der Formel

$$H_2O_2 = H_2 + O_2$$

in molekularen Wasserstoff und Sauerstoff zersetzt werden.

Für eine weitere Gruppe von Enzymen führte Buchner die Bezeichnung „gärende Enzyme" ein. Bei diesen Enzymen findet eine wesentlich andere Veränderung des zu spaltenden Moleküls statt. Es wird eine Umlagerung von Sauerstoffatomen herbeigeführt und durch die Erreichung einer höheren Oxydationsstufe eines Teiles der Verbindung diese selbst zerlegt. Hierher gehört die Zymase, das Enzym der bereits kurz gestreiften alkoholischen Gärung, die mit Sicherheit kaum bei Bakterien nachgewiesen erscheint.

In diese Gruppe ist auch das Enzym der Harnstoffgärung, die Urease, zu setzen. Diese bewirkt eine Zersetzung des Harnstoffes in Ammoniak und Kohlensäure.

Wenigstens vorläufig kann hier auch das Enzym der Milchsäuregärung angeschlossen werden. Allem Anschein nach findet dabei eine glatte Zerlegung von Hexosen in zwei Moleküle Milchsäure statt, entsprechend der Formel

$$C_6H_{12}O_6 = 2\ C_3H_6O_3$$

Dieser Vorgang scheint ohne Wasseraufnahme zu erfolgen, weshalb eine Einreihung desselben unter die Hydrolysen vorläufig nicht angeht.

Dennoch ist dabei eine Beteiligung von Wasser nicht vollends auszuschließen, da die enzymatischen Vorgänge noch keineswegs in allen Phasen durchschaut sind.

Entsprechend dieser kurzen, sich besonders auf Bakterienenzyme beziehenden Übersicht können wir dieselben ungefähr folgendermaßen gruppieren:

I. Schizasen, spaltende Enzyme.

1. Proteasen, eiweißspaltende Enzyme: Pepsin, Trypsin, Papayotin (Lysine, Koagulasen).
2. Kohlenhydratspaltende Enzyme: Amylase, Cellulase, Pektinase, Gelase, Invertase, Laktase.
3. Glukosidspaltende Enzyme: Emulsin (Synaptase).
4. Fettspaltende Enzyme: Lipasen.

II. Oxydierende Enzyme.

Tyrosinase, Essigbakterienoxydase.

III. Reduzierende Enzyme.

Reduktasen.

IV. Gärende Enzyme.

Zymase, Urease, Milchsäureenzym.

III.

Proteolytische Bakterienenzyme.

Allgemeines. Darstellungsmethoden.

Die erste Kunde von proteolytischen Bakterienenzymen, die losgelöst von der lebenden Zelle wirken, erhielten wir durch Bitter im Jahre 1887. Der genannte Untersucher hatte durch halbstündiges Erwärmen auf 60° C von Kulturen des Erregers der asiatischen Cholera und des Vibrio Finkler-Prior die lebenden Zellen vernichtet und damit trotzdem eine Lösung von Fibrin erhalten und damit behandelter Gelatine das Erstarrungsvermögen genommen. Beide genannten Bakterienarten besitzen auch lebend die Fähigkeit, Gelatine energisch zu verflüssigen.

Die Anwesenheit von Proteasen gibt sich gewöhnlich durch die mehr oder minder starke Verflüssigung von Gelatine kund. Damit soll aber keineswegs gesagt sein, daß mangelndes Gelatine-Verflüssigungsvermögen die Anwesenheit von proteolytischen Enzymen in den Zellen ausschließt. Demnach hat man nach Hahn und Geret zwei Gruppen von proteolytischen Enzymen bei den Bakterien zu unterscheiden, die die genannten Autoren als Ektoenzyme und Endoenzyme bezeichnen. Erstere werden von den Mikroorganismen in das umgebende Kultursubstrat sezerniert, während letztere nur nach Schädigungen der Zellen, also in pathologischen Fällen aus denselben austreten. Bei dieser Einteilung ist nun zu bedenken, daß eine scharfe Sonderung nicht leicht durchführbar ist. Man kann beispielsweise bei Bakterienarten, die nur sehr langsam und sehr wenig die Gelatine verflüssigen, schwer entscheiden, ob man es mit einer Endo- oder Ektoprotease zu tun hat. Bei raschem Wachstum einer solchen Bakterienart werden innerhalb kurzer Wachstumszeit sehr viele Bakterienzellen zugrunde gehen und dem Zerfall anheimfallen. Dadurch werden die eventuell vorhandenen Endoproteasen aus den Zellen befreit und wirken dann als Ektoprotease. Es kann aber ebensogut nur eine geringe Menge von Ektoenzym gebildet und dementsprechend nur wenig Gelatine verflüssigt werden. Nach Hahn besteht auch keine nennenswerte Verschiedenheit in der Wirkung beider. Dort wo bei geringer Zellvermehrung große Massen Gelatine verflüssigt

werden, können wir dagegen ohne weiteres auf eine Ektoprotease schließen. Inwiefern Endoproteasen überhaupt berechtigt erscheinen, wird bei der Wirkungsweise der Proteasen erörtert werden.

Es gibt nun mehrere Wege, die Proteasen getrennt von den Bakterienzellen zu untersuchen. Die Wirkung letzterer kann auf einfache Weise durch Töten derselben beseitigt werden. Zahlreiche Untersuchungen haben uns gelehrt, daß in den meisten Fällen die lebende Bakterienzelle gegen schädliche Einflüsse weniger resistent ist, als das Enzym. So hat schon Bitter das proteolytische Enzym von lebenden Vibrionen durch Erwärmen auf 60° befreit, ohne dasselbe wesentlich zu schädigen. In dieser Hinsicht verhalten sich die Enzyme verschieden und es kann die Tötungstemperatur für die Zellen auch schon eingreifende Schädigungen des Enzymes hervorrufen. Außerdem ist die Trennung durch Erwärmung auch bei Kulturen von Bakterien undurchführbar, die Dauersporen bilden. Aus diesen Gründen erscheint diese Methode nicht empfehlenswert.

Im allgemeinen verhalten sich die Enzyme gegen Desinfektionsmittel bedeutend resistenter als die Bakterien. Doch eignet sich für die Tötung der Zellen bei Erhaltung der proteolytischen Enzyme nicht jedes Desinfiziens gleich gut. Am wenigsten schädlich beeinflußt werden die Enzyme durch Thymol, Karbolsäure, Salizylsäure, Toluol und Fluornatrium. Quecksilberchlorid wirkt schon mehr schädigend. Ebenso beeinflußt Chloroform die Enzymwirkungen sehr ungünstig.

Nach van Laer[1]) behält eine mit Chloroform versetzte Malzauflösung ihre diastatische Wirksamkeit nicht länger als höchstens 15 Tage. Nach den Untersuchungen von Vandevelde[2]) bewährt sich dagegen als Desinfektionsmittel für Enzymversuche das Jodoform ausgezeichnet, indem es das Enzym wegen seiner nahezu vollständigen Unlöslichkeit in Wasser gar nicht schädigt, wohl aber jede Bakterienvegetation verhindert. Vandevelde empfiehlt als Lösungsmittel für das Jodoform Keton. Die Ketonjodoformlösung wird der Enzymlösung zugesetzt, worauf durch die Lösung des Ketons in der Enzymflüssigkeit das Jodoform als feinster Niederschlag gefällt und in der Flüssigkeit verteilt wird.

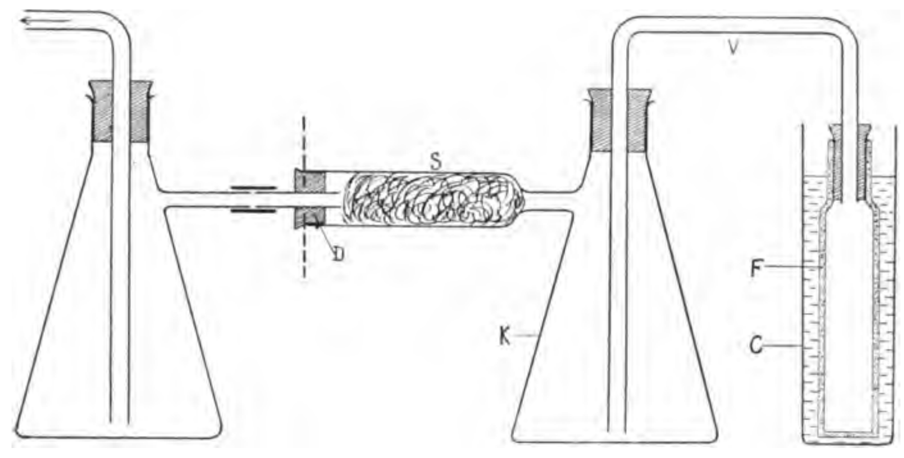
Das unschädlichste Mittel zur Trennung der enzymhaltigen Flüssigkeit von den Bakterienzellen ist entschieden die Filtration durch Chamberland'sche Tonzylinder oder Berkefeldfilter. Diese Methode bringt gar keine Schädigung der Enzyme mit sich und gestattet bei steriler Durchführung eine völlige Ausschaltung jedweden antiseptischen Stoffes. Für die Ausführung kleinerer Laboratoriumsversuche genügen die Filterkerzen, deren oberer Rand entweder glasiert ist oder vor dem Gebrauch mit heißem Paraffin eingelassen wird. Man kann dabei eine Anordnung treffen, die im steril zu haltenden Teile vollständig frei von Kautschukschläuchen ist. Figur 1 zeigt die ganze Anordnung. Der sterile rechte Teil, durch die senkrechte gestrichelte Linie vom übrigen Teil abgegrenzt, besteht aus der Porzellanfilterkerze F, die einen Kautschukstopfen mit einer einfachen Bohrung trägt, in die das Verbindungsrohr V dicht eingepaßt ist. Der dickwandige Kolben K hat einen seitlichen An-

---

[1]) Van Laer, Bull. denr. aliment. 1901.

[2]) Vandevelde, Biochem. Zeitschr. Bd. III, 1907, S. 315 (hier Zusammenstellung der Literatur über Antiseptika gegenüber Enzymen).

satz S, dessen erweiterter Teil eine Länge von 12—15 cm besitzt. Die obere Öffnung trägt einen Kautschukstopfen mit einfacher Bohrung, in die das Verbindungsrohr V ebenfalls dicht eingeschoben werden kann. Der verbreiterte Teil des Ansatzes ist mit Watte gefüllt. Zum Gebrauch führt man das Verbindungsrohr im Kautschukstopfen des Filters bis zum unteren Stopfenrand ein, setzt dann den Kautschukstopfen mit dem Rohr in den Filterhals, verschließt die obere Öffnung des Kolbens (K) mit dem dazu gehörigen durchbohrten Kautschukstopfen und führt durch diesen



Figur 1.

das Verbindungsrohr bis knapp an den Kolbenboden. Diese Zusammenstellung wird dann durch eine Stunde im strömenden Dampf sterilisiert. Nach dem Erkalten wird das offene Ende des erweiterten Kolbenansatzes S luftdicht in der angedeuteten Weise mit einer gewöhnlichen Absaugeflasche verbunden und diese an eine Wasserstrahlsaugpumpe angeschlossen. In den um ungefähr $^1/_3$ weiteren Standzylinder C wird nun das Filter eingesenkt und die zu filtrierende Kulturflüssigkeit bis zur Hälfte des glasierten oder nach dem Sterilisieren paraffinierten Filterhalses eingegossen. Nun ist während des Filtrierens darauf zu achten, daß das Niveau der Flüssigkeit im Zylinder immer auf der gleichen Höhe bleibt, was durch fortwährendes Nachgießen leicht zu erreichen ist. Um möglichst die gesamte Menge der Kulturflüssigkeit abzufiltrieren, stellt man die Niveauhöhe mangels weiterer Flüssigkeit durch Einwerfen von Porzellanschrot oder Glasperlen her. Am Schlusse löst man zuerst die Verbindung bei D und hebt den Kolben K samt dem Filter weg. Bevor man letzteres entfernt, hält man eine sterile mit einem Wattebausch verschlossene Eprouvette bereit, in deren Hals der Kautschukstopfen des Filters gut paßt. Bevor man das Filter abzieht entfernt, man aus der Eprouvette den Wattebausch, glüht den Rand in der Flamme kurz ab, läßt mit der Öffnung nach unten abkühlen, beseitigt rasch das Filter und schiebt an dessen Stelle die Eprouvette auf. Es empfiehlt sich, kurze der Filterlänge entsprechende Eprouvetten zu verwenden. Auf diese Weise erhält man sterile Kulturfiltrate, denn gegen die Infektion durch die mit der

bei D einströmenden Luft mitgerissenen Mikroorganismen schützt das Wattefilter im Ansatz S und die anstelle des Filters angesetzte Eprouvette bewahrt vor einer Infektion von der anderen Seite. Um bei längerer Aufbewahrung des Kulturfiltrates dieses vor Eintrocknung zu bewahren, tut man gut, die Öffnung des erweiterten Ansatzes mit einem Kork- oder Kautschukstopfen zu verschließen. Diese Anordnung ermöglicht auch eine leichte und vollständig sterile Entnahme des Filtrates. Man bläst einfach durch das Wattefilter Luft und drückt so eine beliebige Menge des Inhaltes durch das Rohr V heraus, nachdem man zuvor die vorgesetzte Verschlußeprouvette entfernt hat. Man kann natürlich beliebig oft auf diese Weise Filtrat entnehmen, nur muß man dafür sorgen, daß das Ausflußrohr sofort wieder mit einer sterilen Proberöhre verschlossen wird.

Einfacher gestaltet sich die Filtration dann, wenn man auf die Gewinnung eines sterilen Filtrates verzichtet und zur Verhinderung des Auswachsens hineingelangter Bakterien ein Antiseptikum zusetzt. Die Zugabe von Toluol erweist sich in diesem Falle am zweckmäßigsten, da es einerseits jedes Bakterienwachstum unterdrückt und anderseits am unschädlichsten für die Enzyme ist. Für 100 cm^3 Kulturfiltrat genügen ungefähr 2 cm^3 Toluol. Man schüttelt sehr gut durch und verschließt dann mit einem Stopfen. Nach einiger Zeit sammelt sich das Toluol an der Oberfläche des Filtrates an und man kann dann mit einer Pipette, die man unter die Toluolschicht einsenkt, die vollständig klare Flüssigkeit zum Gebrauche aussaugen.

Die soeben geschilderte Methode der Trennung der enzymhaltigen Flüssigkeit von den lebenden Bakterien ist weitaus die beste, sofern man über gute Tonkerzen verfügt. Die von der Berliner Porzellanmanufaktur hergestellten Tonfilter sind im allgemeinen vollkommen bakteriendicht und vertragen die Sterilisation im strömenden Dampf sehr gut. Man kann die Filter wiederholt gebrauchen. Am besten ist es, sie unmittelbar nach dem Gebrauche auf 12—24 Stunden in eine 2proz. Lysollösung zu legen und sie dann mit einer Bürste außen gründlichst zu reinigen. Dann preßt man durch einige Stunden Leitungswasser hindurch, indem man den Hals direkt durch einen Schlauch mit einem Wasserleitungshahn verbindet und unter mäßigem Druck Wasser einlaufen läßt. Darauf empfiehlt es sich, einigemale destilliertes Wasser durchzusaugen und dann trocknen zu lassen. Unmittelbar vor dem Wiedergebrauch sterilisiert man das montierte Filter in der angegebenen Weise im Dampftopf. Eine sofortige Sterilisation in der Hitze unmittelbar nach dem Gebrauch ist deshalb zu vermeiden, weil in die äußeren Partien, wenn auch nicht tief, doch koagulierbare Substanzen eindringen und diese in der Hitze ausfallen und die Filterporen verlegen. Derartig behandelte Filter filtrieren dann sehr langsam.

Die Methode der Kulturfiltration gestattet nur die zellenfreie Gewinnung von Lösungen derjenigen Enzyme, die entweder während des Lebens von den Mikroorganismen in die Umgebung ausgeschieden werden oder aber nach dem Tode der Zellen aus diesen austreten. Hahn und Geret konnten nun durch Anwendung eines anderen Verfahrens auch proteolytische Enzyme in Bakterien nachweisen, die in ihren Kulturen durch keine Verflüssigung von Gelatine, koaguliertem Eiweiß oder Kasein die Produktion eines solchen verraten. Solche unter normalen Verhält-

nissen mit der Zelle unzertrennbar verbundene Enzyme können durch Zertrümmern der lebenden Zellen freigemacht werden. Auf die gleiche Weise trennten Buchner und Hahn das Enzym der alkoholischen Gärung von der Hefezelle. Das Wesentlichste dabei ist die sichere Zerreißung der Zellwände, wodurch das halbflüssige Protoplasma in Freiheit gesetzt wird. Bei der Hefe erreichten die genannten Autoren dieses Ziel dadurch, daß sie gewaschene Hefemassen durch Auspressen unter einem Druck von 50 Atmosphären entwässerten und die halbtrockene Masse mit Quarzsand unter Zugabe von Kieselgur in einer Porzellanreibschale zerrieben. Es entsteht dabei eine teigartige Masse, da die Kieselgur die Feuchtigkeit aus dem austretenden Protoplasma aufnimmt. Dieser Teig wird nun unter hohem Druck von ungefähr 300 Atmosphären, was entsprechend der drückenden Fläche für den Quadratzentimeter einen Druck von ungefähr 90 kg ausmacht, ausgepreßt und der abfließende Preßsaft sofort in einem eisgekühlten Gefäß aufgefangen. Von den gröberen mitgehenden Partikeln wird der Saft durch ein gewöhnliches Faltenfilter befreit. Zur besseren Ausnutzung kann der Preßrückstand unter Zusatz von wenig oder auch gar keinem Wasser ein zweites Mal zerrieben und nochmals abgepreßt werden. Dabei ergibt sich eine Gesamtausbeute von rund 60 Prozent der Plasmamasse. Zur Erzeugung des notwendigen hohen Druckes dient eine hydraulische Presse.

Durch Anwendung des Preßverfahrens konnten nun Hahn und Geret auch aus Tuberkel- und Typhusbazillen ein proteolytisches Enzym erhalten.

Durch Gefrieren bei sehr großen Kältegraden werden flüssige und weiche Körper enorm spröde. Gestützt auf diese Erfahrung versuchte man auch eine Zertrümmerung der in flüssiger Luft oder Kohlensäure gefrorenen Zellen und erhielt in dem aus dem Brei erhaltenen Preßsaft ebenfalls eine sehr enzymatisch wirksame Substanz. Dieses Verfahren bietet aber gegenüber dem Buchner-Hahn'schen keinen Vorteil und erfordert zur Ausführung nur viel mehr Zeit.

Sowohl die durch Filtration gewonnenen als auch durch Auspressen hergestellten enzymreichen und zellenfreien Substanzen enthalten neben den Enzymen noch eine Reihe der verschiedensten Nebenprodukte. Wir finden in den Bakterienkulturen neben den eigentlichen Stoffwechselprodukten noch durch Vergärung oder Enzymtätigkeit erzeugte Stoffe und endlich noch große Mengen des unzersetzt gebliebenen Nährsubstrates. Man war deshalb bemüht, durch Ausschaltung aller Nebenprodukte das Enzym möglichst rein zu erhalten und trachtete überhaupt die Enzyme als chemisch definierbare Substanzen zu gewinnen. Dieses Streben ist leider noch nicht vom gewünschten Erfolg gekrönt, doch gelang es durch eine Reihe von Methoden wenigstens reinere und wirksamere Enzymlösungen zu erhalten. Schon früh erkannte man, daß in enzymhaltigen Flüssigkeiten hervorgebrachte Niederschläge die Enzyme mitreißen. So bewirkt absoluter Alkohol, im Überschuß einem Kulturfiltrat oder einem Preßsaft zugesetzt, einen Niederschlag, der sowohl die proteolytischen als auch die anderen Enzyme enthält. Wenn man nun diesen durch Waschen mit starkem Alkohol reinigt und wieder in Wasser löst, so erhält man sehr wirksame Enzymlösungen, deren Wirksamkeit natürlich mit der Abnahme des Lösungsmittels zunimmt. Um die

in den Kulturflüssigkeiten enthaltenen Salze auszuschalten, dialysiert man die Kulturfiltrate gegen Leitungswasser und destilliertes Wasser. Als Membran verwendet man Pergament, das den Salzen einen ungehinderten Durchtritt gestattet, die Enzyme aber zurückhält.

Claudio Fermi hat die Alkoholfällung von proteolytischen Enzymen aus den verflüssigten Massen der Gelatinekulturen einer eingehenden Untersuchung unterzogen. Dabei machte er die Beobachtung, daß es durch eine fraktionierte Fällung mit Alkohol gelingt, eine Menge sonst mit ausfallender Substanzen zu entfernen und schließlich ein reineres Enzympräparat zu gewinnen. Bei der geeigneten Alkoholkonzentration fällt der größere Teil der durch Alkohol abscheidbaren Substanzen früher aus, während die Proteasen noch gelöst bleiben und aus dem Filtrat durch weiteren Alkoholzusatz mit weniger Verunreinigungen ausgeschieden werden.

Die für die erste enzymfreie Fällung geeignetste Alkoholkonzentration ermittelte Fermi durch eine große Reihe von Versuchen für den Vibrio cholerae asiaticae, Vibrio Finkler-Prior, Pseudomonas pyocyanea und Bacillus prodigiosus. Dabei ergab sich als zweckmäßigste Alkoholzugabe zu 200 cm^3 der verflüssigten Gelatinekultur des Choleravibrio und der Pseudomonas pyocyanea ein Zusatz von 200 cm^3 65 proz. Alkohol und für die gleiche Menge der verflüssigten Gelatinezucht des Vibrio Finkler-Prior und Bacillus prodigiosus eine Zugabe von 200 cm^3 70 proz. Alkohol. Der entstandene Niederschlag wurde dann durch 24 Stunden absitzen gelassen und abfiltriert. Das Filtrat wird durch einen weiteren Zusatz von absolutem Alkohol auf das doppelte Volumen gebracht und der neuentstandene und das Enzym enthaltende Niederschlag auf einem Filter gesammelt, mit starkem Alkohol gewaschen und dann im Exsikkator unter Absaugen getrocknet. Zur Gewinnung noch reinerer Präparate kann der enzymhaltige Niederschlag in wenig Wasser gelöst der Dialyse unterworfen und neuerlich mit Alkohol gefällt werden. Für den Gebrauch löst man das trockene Präparat zweckmäßig in Thymolwasser. Dies stellt man sich einfach dar, indem man gepulvertes Thymol in der Menge von 2 g auf 1 l in Wasser gibt und unter Umschütteln durch einige Stunden sich lösen läßt. Zum Gebrauch filtriert man von dem ungelösten Thymol ab.

Statt Alkohol kann man auch mit gutem Erfolge eine Mischung von zwei Raumteilen Äthylalkohol und einem Raumteil Äthyläther verwenden. In diesem Falle trägt man in 600 cm^3 des Gemisches ungefähr 50 cm^3 der verflüssigten Gelatinekultur oder der Bouillonkultur des betreffenden Mikroorganismus ein. Hier werden sämtliche fällbaren Substanzen mit dem Enzym abgeschieden. Dieses Verfahren findet besonders zur Behandlung der Preßsäfte Anwendung, von denen man die gleiche Menge unter Umrühren einträgt. Der weitere Vorgang ist der gleiche wie bei der Alkoholfällung, nur kann man für die letzte Waschung des Niederschlages auf dem Filter Äther verwenden. Man erhält auf diese Weise sehr rasch ein trockenes Präparat. Überhaupt ist auf möglichst kurze Behandlung mit Alkohol großes Gewicht zu legen, da erwiesenermaßen Alkohol das Enzym bei längerer Einwirkung bedeutend schädigt.

In dieser Hinsicht ist Azeton als Fällungsmittel ungefährlicher. Man muß aber auf 1 Volumen Preßsaft oder Bakterienkulturfiltrat 10 Vo-

lumina dieses Fällungsmittel anwenden. Wenigstens für Hefepreßsaft konnte auch damit durch fraktionierte Fällung keine Trennung des Enzyms von einem Teil der Nebenfällungsprodukte erreicht werden. Übrigens bietet die Anwendung von Azeton gegenüber den genannten Methoden keinen Vorteil und soll auf proteolytische Enzyme ungünstiger wirken als Alkohol und das Gemisch von Alkohol und Äther.

Alle durch die genannten Fällungsmethoden erhaltenen und getrockneten Niederschläge lösen sich in reinem Wasser nicht mehr vollständig auf. Ein geringer Zusatz von Glyzerin befördert etwas die Lösung und führt kräftigere Wirkungen der Enzymlösungen herbei. Glyzerin extrahiert überhaupt sehr leicht Enzyme und schon Hüfner erhielt aus faulendem Käse proteolytisch wirksame Auszüge.

IV.

Fortsetzung der proteolytischen Bakterienenzyme.

Untersuchungsmethoden.

Die Wirkung der Proteasen äußert sich nun in einer Auflösung von erstarrter Leimgallerte oder von koaguliertem Eiweiß und in einer tiefen Spaltung dieser Substanzen. Als Reagenzien auf diese Kategorie von Enzymen dienen daher in erster Linie Gelatine, in der Hitze koaguliertes Eiereiweiß, frisches oder gekochtes Fibrin und Kasein. Diese Stoffe sind wohl die gebräuchlichsten. Außerdem können steriles Blutserum und Lösungen der hoch zusammengesetzten Spaltungsprodukte von Eiweißkörpern wie Peptone zum weiteren Abbau mit proteolytischen Enzymen versetzt werden. Die Wirkung wird hier natürlich nicht ohne weiteres wahrzunehmen sein, sondern muß durch chemische Reaktionen oder aus dem optischen Verhalten der Lösungen nach verschieden langer Einwirkungsdauer des Enzymes erschlossen werden.

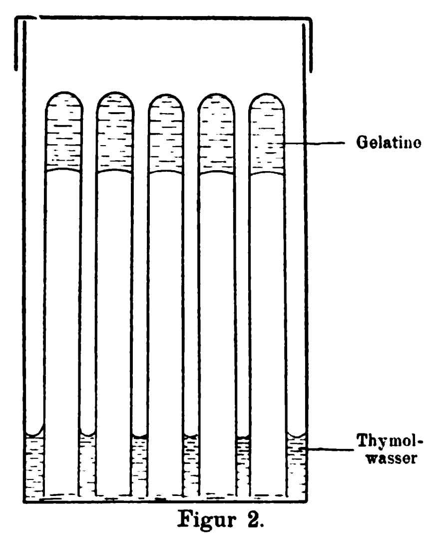
Das meist gebrauchte Reagens auf Proteasen ist eine erstarrte Gelatine. Durch die Einwirkung dieser Enzyme erleidet die Gelatine eine Zersetzung, die sich durch das Verlieren des Erstarrungsvermögens kund gibt. Schon Bitter hatte die Wirkung des proteolytischen Enzymes vom Choleravibrio und Vibrio Finkler-Prior dadurch festgestellt, daß er ein wenig der bei 60° sterilisierten Choleragelatinekultur in Gläser mit Nährgelatine brachte und bei 37° C hielt. So behandelte Proben hatten ihr Erstarrungsvermögen eingebüßt, denn selbst bei 0° erstarrte die Gelatine nicht mehr zu einer Gallerte.

Mavrojanus behandelt die in der Wärme von Mikroben verflüssigte Gelatine mit Formaldehyd und bekommt dann noch Erstarrung, wenn keine tiefere Spaltung des Leimes eintrat. Abkühlen konnte selbst in diesen Fällen kein Festwerden mehr herbeiführen. Leider sind diese Versuche nur mit einer Anzahl von verschiedenen lebenden Bakterienkulturen ausgeführt und nicht auf Kulturfiltrate dieser Mikroben erstreckt.

Fermi hat nun die Gelatine als Reagens auf proteolytische Enzyme nach allen Richtungen hin untersucht und sehr empfindliche Methoden ausgearbeitet, die selbst den Nachweis äußerst geringer Spuren dieser Fermente gestatten. Außerdem erlauben sie auch eine quantitative Be-

stimmung der Enzymwirkung, wobei für die proteolytischen Enzyme von den einzelnen Bakterienarten Zahlen erhalten werden, die für die Vergleichung der Wirksamkeit von gewissem Werte sind. Durch die Messung der enzymatischen Umsetzungen in verschiedenen Reaktionszeiten kann man wenigstens annähernd auf die dabei obwaltenden Gesetze schließen. Allerdings müssen wir dabei sehr vorsichtig sein und uns immer vor Augen halten, daß wir es nicht mit reinen Enzymlösungen zu tun haben und daß in allen diesen wirksamen Lösungen mehrere Enzyme und nicht nur proteolytische vorhanden sind, die wir bei unseren jetzigen Darstellungsmethoden nicht auszuschalten vermögen.

Für den Nachweis von proteolytischen Enzymen eignet sich am besten Gelatine, die in kleinen Röhrchen erstarrt ist und mit der auf Proteasen zu untersuchenden Flüssigkeit überschichtet wird. Man verwendet kleine Proberöhrchen, die eine innere Lichte von 7—8 mm besitzen. Sollen zugleich quantitative Bestimmungen ausgeführt werden, so müssen Röhrchen von vollkommen gleicher Lichte benutzt werden, denn in diesem Falle muß die Berührungsfläche zwischen Gelatine und Enzymlösung gleichgroß und die Höhen der Gallerte und der überstehenden Flüssigkeit bei gleichem Volumen derselben ebenfalls gleich sein. Außerdem müssen sämtliche zu einem Versuche verwendeten Röhrchen die gleiche Konzentration der Gelatinegallerte aufweisen. Auch soll die Gelatine in allen Proben denselben Schmelzpunkt besitzen. Diese Bedingungen können nur dadurch erfüllt werden, daß man gleichzeitig einen größeren Vorrat angefüllter Röhrchen herstellt und diese vor Austrocknung geschützt aufbewahrt. Liegen zwischen der Verwendung größere Zeiträume, empfiehlt sich vor dem Gebrauch eine Feststellung des Schmelzpunktes. Diese erfolgt am einfachsten dadurch, daß man unter sehr vorsichtigem Erwärmen auf dem Wasserbad in einem dünnwandigen Röhrchen ein Stückchen der erstarrten Gelatine zum Schmelzen bringt und beim Eintritt der Verflüssigung am unmittelbar daneben befindlichen Thermometer die Temperatur abliest. Bei dem sehr niedrigen Schmelzpunkt der Gelatine ist eine Korrektur für diese Zwecke unnötig. Am besten befestigt man das Röhrchen mit der Schmelzprobe durch ein Gummiband unmittelbar am Thermometer so, daß die Probe und das Quecksilbergefäß des Thermometers sich in gleicher Höhe befinden. Daß während der Erwärmung des Wassers fortwährend gerührt werden muß, ist wohl selbstverständlich. Für einige Monate gleichmäßig erhält man die Gelatine, wenn die gefüllten Röhrchen umgekehrt mit dem offenen Ende in ein Wasserbad eintauchen. So vermeidet man jede Eintrocknung derselben. In Figur 2 ist die Aufbewahrung unter Wasserverschluß wiedergegeben. Um auch das Wasser von Bakterien frei zu erhalten, kann man in dasselbe ein Stückchen Thymol geben.



Figur 2.

Nach der Versuchstemperatur ist nun die Konzentration der Gelatine zu wählen. Im allgemeinen löst man 2, 5, 7, 10 oder 20 g feinster Gelatine in 100 cm³ Thymolwasser oder 5 ‰ Karbolsäurelösung. Dabei ist zu beobachten, daß die Lösung bei einer Temperatur von höchstens 70° C geschieht und jedes Kochen vermieden wird, da dadurch das Erstarrungsvermögen beeinträchtigt wird. Die Reaktion der Gelatine wird durch Zusatz von kohlensaurem Natron neutral gestellt oder durch weitere Zugabe von Soda bis zu 2 Proz. Gehalt schwach alkalisch gemacht. Will man mit saurer Gelatine arbeiten, so säuert man auf höchstens 5 ‰ mit Mineralsäuren und auf das doppelte mit organischen Säuren an. Eine Filtration der Gelatine ist unnötig, da reine Gelatine in der dünnen angewendeten Schicht fast vollständig klar ist.

Um nun die in gewissen Zeiten eingetretene Verflüssigung zu messen, bringt man an jedem Röhrchen der Länge nach ein Streifchen Papier an und notiert darauf die ursprüngliche Niveauhöhe der immer in einer Menge von 1 cm³ eingebrachten Gelatine und die nach verschiedenen Zeiten abgelesenen Höhen der noch starren Gelatine. Es hebt sich die Grenzlinie zwischen Flüssigkeit und starrer Gelatine wegen der verschiedenen Lichtbrechung beider Medien sehr scharf ab. Die Differenzen der einzelnen Marken in Millimetern gemessen ergeben direkt die Höhen der verflüssigten Gelatine, die als Maß für die Enzymwirkung verwendet werden können. Eine sehr genaue Ablesung erhält man, wenn man einen in halbe Millimeter geteilten auf Papier mit Tusche angezeichneten Maßstab mit der bezeichneten Seite aufklebt und nun gegen das Licht die Niveaustände an der aufgeklebten Teilung abliest. So können $^1/_2$ mm noch direkt abgelesen und Zehntel noch geschätzt werden, genau so wie bei der Ablesung an jeder Bürette. Bei dieser Versuchsanordnung findet keine rasche Verteilung der entstandenen Lösungsprodukte in der Flüssigkeit statt, sofern man nicht häufig umschüttelt. Dadurch wird die Verflüssigung bedeutend verlangsamt. Dafür besitzt diese Methode den großen Vorteil, mit sehr geringen Mengen von Material arbeiten zu können.

Die von Mett und Linossier eingeführte Abänderung der genannten Methode bedeutet insofern keinen Fortschritt, als sie für große Versuchsreihen zu kompliziert ist und durch geringe Zwischenfälle die erhaltenen Ergebnisse sehr in Frage bringt. Sie besteht im wesentlichen darin, die gefärbte Gelatine in Kapillaren zu deponieren und diese dann in die Enzymlösung einzulegen. Nach bestimmten Zeiten entnimmt man die Kapillaren, trocknet sie ab und mißt die Höhen der gelösten Mengen unter dem Mikroskope an einem Maßstabe. Auch hier ist die Verteilung der gelösten Mengen in der Flüssigkeit nur durch Umschütteln zu erreichen.

Eine gute Verteilung der gelösten Produkte erhält man aber dadurch, daß man die vollständig aufgefüllten Röhrchen dicht verschließt und umgekehrt aufstellt, so daß die Enzymflüssigkeit unten, die Gelatine oben sich befindet. Vollständig luftfreie Füllungen, die hier aber unbedingt gefordert werden müssen, sind nur sehr schwierig zu erreichen.

Dasselbe Prinzip kann aber durch folgende Anordnung sehr leicht und bequem angewendet werden und ergibt sehr genaue Resultate. Figur 3 stellt uns diese Anordnung dar. In einerProberöhre von 8—10 mm innerem Durchmesser ist durch einen gut passenden Kork-

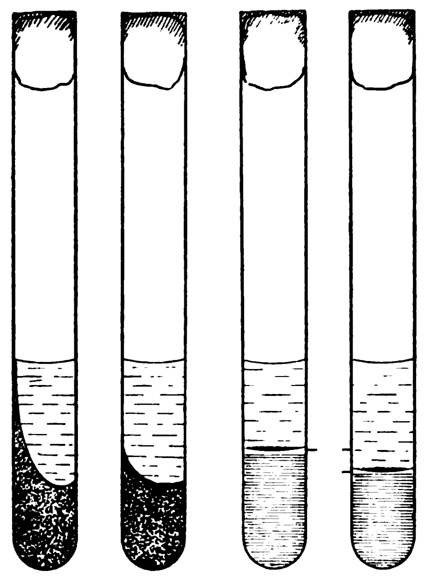
stopfen ein Glasstab (Gl) verschiebbar eingesenkt, an dessen unterem Ende ein kleines Eprouvettchen (G) von 3—4 mm innerer Lichte angeschmolzen ist. Dasselbe kann eine Millimeterteilung tragen. Zweckmäßiger wird an der großen Eprouvette ein Papiermaßstab aufgeklebt. In diese große Eprouvette kommt nun die zu untersuchende Enzymlösung E in einer Menge von 1—2 cm³. Das kleine Röhrchen wird mit Thymolwassergelatine vollständig gefüllt. Nach dem Erstarren derselben senkt man es mit dem Glasstabe solange, bis dessen unteres Ende ungefähr einen Millimeter in die Flüssigkeit eintaucht. Man hat nur nötig, nach bestimmten Zeiten die Verflüssigung durch Ablesen der Grenzlinie festzustellen, was in der Durchsicht gegen die Skala sehr scharf geschehen kann. Verwendet man, wie es Figur 4 zeigt, eine etwas weitere große Eprouvette mit einem zweifach gebohrten Kork, kann man zwei gleich kalibrierte Gelatineröhrchen einsenken und dann aus beiden Verflüssigungszahlen genauere Mittelzahlen rechnen. So wird jede Versuchsreihe auf bequeme Weise und vollständig exakt und unter identischen Bedingungen doppelt ausgeführt, ein gewiß nicht zu unterschätzender Vorteil.

St
Gl
G
E

Figur 3. Figur 4.

Um nun die Wirkung sehr geringer Mengen von proteolytischen Enzymen sichtbar zu machen und eine besonders scharf markierte Grenzlinie zwischen der Gallerte und der Flüssigkeit zu erhalten, hat man entweder die Gelatine mit nicht löslichen feinsten Teilchen versetzt oder unlösliche Partikelchen in der Enzymlösung suspendiert. So benutzt Schouten eine 7.5 proz. Gelatine in gesättigtem Thymolwasser, die mit feinstzerriebenem Zinnober versetzt ist. Nach dem genannten Autor wird zur Vergrößerung der Oberfläche der Gelatine und zur Erhöhung der Empfindlichkeit für kleinste Enzymmengen dieselbe schief erstarrt. Schouten verfährt dabei folgendermaßen: Unmittelbar vor dem Einfüllen der Thymolgelatine wird dieselbe mit feinst pulverisiertem Zinnober versetzt und dieser in der bei niederer Temperatur verflüssigten Gelatine sehr gleichmäßig verteilt. Dann kommt von der Gelatine-Zinnober-Emulsion in Proberöhrchen eine Portion von je 5 cm³ und der Inhalt der beschickten Röhrchen wird in einem Wasserbad von 40° C flüssig erhalten. Sobald die gewünschte Menge von Eprouvetten gefüllt ist, werden die einzelnen Proben nach kurzem kräftigen Durchmischen je 10 Sekunden unter dem Wasserstrahl der Leitung in schräger Stellung abgekühlt und dann senkrecht gestellt erstarren gelassen. Durch die kurze Abkühlung in der Schrägstellung erstarrt die an der Eprouvettenwand befindliche Gelatine in dünner Schicht und bei der darauf folgenden senkrechten Aufstellung fließt die nicht erstarrte überschüssige Gelatine ab und erstarrt dann im unteren Teil der Eprouvette. Wenn nun die Enzymlösung aufgegossen wird, bietet sich ihr eine sehr große und dünne Gelatinefläche dar, die durch den suspendierten Zinnober deutlich sichtbar ist. Selbst eine sehr geringe Lösung derselben zeigt sich dann an dem Durchsichtigerwerden der Gelatineschicht und dadurch, daß sich ein Über-

schuß von freigewordenem Zinnober an der untersten Stelle der Berührungsfläche zwischen Lösung und Gallerte ansammelt. In Figur 5 sind solche nach Schouten hergestellte Gelatineröhrchen wiedergegeben. In der linken Proberöhre zieht sich die Zinnober-Gelatineschicht in dünner Lage hoch hinauf. Die auf proteolytische Enzyme zu untersuchende Lösung ist darüber geschichtet. In der rechten Eprouvette hat die Verflüssigung bereits eingesetzt und der größte Teil der schiefen Gelatineschicht ist weggelöst. Der freigewordene Zinnober hat sich in dickerer Schicht an der Trennungsfläche zwischen Enzymlösung und starrer Gelatine angesammelt. Statt Zinnober können auch andere schwere nicht lösliche Verbindungen mit Vorteil verwendet werden. Besonders gut bewährt sich schwefelsaurer Baryt.



Figur 5. Figur 6.

Um nun die Grenzlinie besonders markiert zu erhalten, kann man die auf gerade erstarrte Gelatine aufgeschichtete Enzymlösung mit Zinnober oder schwefelsaurem Baryt versetzen. Die nach Fermi hergestellten geraden Gelatineröhrchen werden mit der auf proteolytische Enzyme zu untersuchenden Flüssigkeit beschickt und dazu noch ein wenig schwefelsaurer Baryt gegeben. Schon nach kurzer Zeit sammelt sich an der Grenzfläche zwischen Flüssigkeit und Gallerte das schwere und in Wasser unlösliche Barytsalz als Niederschlag an, wie es in Figur 6 das linke Röhrchen zeigt. Nachdem der Stand an dem Papierstreifchen notiert oder an der befestigten Skala abgelesen wurde, bringt man die Probe in eine konstante Temperatur, deren Höhe sich nach der Konzentration der Gelatine richtet. Die nach bestimmten Zeiten eingetretene Verflüssigung wird durch das Herabsinken des immer an der Grenzfläche zwischen Lösung und Ungelöstem bleibenden Baryumsulfates angezeigt, wie es das rechte Röhrchen in Figur 6 illustriert.

Da Konzentrationsänderungen in der Flüssigkeit den Gang der proteolytischen Gelatinelösung wesentlich beeinflussen, ist besonders jede Verdunstung hintanzuhalten. Dies erreicht man dadurch, daß man die Proberöhrchen mit einem Wattebausch versieht und darauf verflüssigtes Paraffin gießt, wie es in den Figuren 5 und 6 angedeutet ist, oder dadurch, daß man die Röhrchen versiegelt.

Für viele Zwecke eignet sich zum Nachweis von Proteasen auch die Methode der Gelatineplatten. Man gießt die Karbol- oder Thymolgelatine in Petrischalen in einer Dicke von 1—3 mm aus und läßt erstarren. Dann saugt man enzymhaltige Substrate, die durch eine Desinfektion mit 1—3proz. Karbolsäurelösung von allen lebenden Bakterien befreit sind, in poröse Stoffe, wie kleinste Bausteinstücken oder Filtrierpapierstückchen auf und legt diese auf die Gelatinefläche. Dem Gehalt an

Proteasen entsprechend wird in denselben und unter denselben eine mehr oder minder große Menge der Gelatine verflüssigt. Grobe quantitative Unterschiede können damit schon festgestellt werden, für feinere Untersuchungen eignet sich diese Methode jedoch nicht. Durch Aufbewahren der beschickten Gelatineplatten in einer feuchten Kammer verhütet man auch hier die Verdunstung und Eintrocknung.

Über die Empfindlichkeit der verschiedenen Gelatinemethoden läßt sich im allgemeinen aussagen, daß eine Reihe von Faktoren dieselbe zu erhöhen, bezw. herabzusetzen imstande ist. Einen wesentlichen Einfluß übt hier die Konzentration bei neutraler Reaktion der Gelatine aus. Es kann dafür der Satz gelten: Je höher die Konzentration, desto geringer die Empfindlichkeit. Dementsprechend wird man bei Untersuchungen, die bei einer Temperatur von unter 25° C ausgeführt werden, eine 3—7 proz. Gelatine benutzen und zu höheren Konzentrationen nur dann greifen, wenn die Untersuchungstemperatur 25° C übersteigt. Ein Zusatz von geringen Sodamengen erhöht die Empfindlichkeit der Gelatine für Proteasen wesentlich. Dabei erweist sich eine Alkalisierung auf 1 Proz. Natriumkarbonatgehalt am zweckmäßigsten. Für gewöhnlich reicht man bei Untersuchungen in einer Temperatur von 20° C mit einer 5proz. Gelatine aus, die entweder neutral ist oder 1 Proz. kohlensaures Natron krist. enthält.

Fermi untersuchte noch eine Reihe von Agentien auf ihre Fähigkeit, die Empfindlichkeit der Gelatine als Reagens auf proteolytische Enzyme zu erhöhen. Dabei ging er von der Überlegung aus, daß einerseits die Wegschaffung der gelösten Massen und andererseits eine möglichste Konzentrierung der geringsten Enzymspuren auf das Reagens einen günstigen Einfluß auf die Lösung ausüben müßten. Daß die Umkehrung der bis an den Rand gefüllten Röhrchen und das senkrechte Eintauchen derselben die Geschwindigkeit der Verflüssigung durch teilweise Entfernung der gelösten Produkte wesentlich vergrößert, wurde schon erwähnt. Ein Parallelversuch mit aufrechten und umgekehrt eingetauchten Röhrchen ergibt für letztere ungefähr eine doppelt so schnelle Verflüssigung. Eine Kontaktverbesserung zwischen Enzym und Gelatine sieht Fermi durch Beigabe von unlöslichen Pulvern zu Trypsinlösungen zu erreichen. Auf diese Fähigkeit wurden viele Substanzen geprüft, wie z. B. Eisen, Antimon, Zink, Schwefel, Eisenoxydhydrat, Zinkoxyd, bas. Wismuthnitrat, Magnesiumkarbonat, Magnesiumoxyd, Calciumkarbonat, Berlinerblau, Reisstärke, Knochenkohle u. dgl. m. Am wirksamsten erwies sich ein Zusatz von geringen Mengen Knochenkohle zur Emzymlösung.

Die auf eine der angegebenen Arten besonders empfindlich gemachte Gelatine gestattet noch den Nachweis von Trypsin in einer Verdünnung von 1 : 1000000, bei Verwendung von 1 cm³ der verdünnten Trypsinlösung. Die höchste Empfindlichkeit erreichte Fermi mit einer 1 proz. Gelatine, enthaltend 1 Proz. Soda, die er mit 1 cm³ der verdünnten Enzymlösung überschichtete. Dabei ergab eine Auflösung von Grüblers Trypsin im Verhältnis von 1 : 1300000 in 5 Tagen eine deutliche Lösung (1,5 mm), eine Auflösung im Verhältnis von 1 : 1400000 nach 8 Tagen eine Verflüssigung von 1 mm. Es ist dies in der Tat eine ganz erstaunliche Empfindlichkeit, wenn man bedenkt, daß dementsprechend die hier in Reaktion tretende Menge von 1 cm³ nur 0,0007142 mg Trypsin enthält.

Als weiteres Reagens auf proteolytische Enzyme ist Fibrin zu erwähnen. Dieses wird entweder frisch aus Blut gewonnen verwendet oder vor dem Gebrauch gekocht. Im allgemeinen ist es in frischem Zustande den Bakterienproteasen leichter zugänglich als gekocht. Trotzdem empfiehlt sich eine Anwendung im frischen Zustande nur dann, wenn es bei 3—4° C gewaschen und sofort in Thymolwasser eingelegt zum Gebrauch kommt. Sobald man aber dasselbe aus Blutkuchen durch längeres Auswaschen derselben in Leitungswasser bei 10—12° C gewinnt, empfiehlt sich die Abkochung desselben, da sonst durch die darauf angesiedelt gewesenen Bakterien, bezw. deren proteolytische Enzyme auch ohne Zutun eines weiteren Enzymes eine Auflösung desselben herbeigeführt werden kann, was natürlich zu falschen Ergebnissen führen kann, wenn nicht besondere Kontrollversuche gemacht werden. Diese sind übrigens immer mit anzustellen. Gekochtes Fibrin hält sich in Thymolwasser aufbewahrt, lange Zeit unverändert. Für die Demonstration kann man das Fibrin auch färben und sieht dann an der entstehenden Färbung der Lösung die Wirkung der Proteasen, die annähernd auch entsprechend der Intensität der Färbung geschätzt werden kann. Grübler bringt für diesen Zweck mit Karmin gefärbtes Fibrin in den Handel. Man kann sich dasselbe auch mit Boraxkarmin oder Alaunkarmin selbst färben. Die Fibrinflocken kommen auf einige Stunden in die Farblösung und werden mit sehr verdünnter (1 : 1000) Salzsäure gut ausgewaschen und außerdem noch 12 bis 14 Stunden in kaltem fließenden Wasser ausgewässert, bis keine Farbe mehr abgegeben wird. Dabei ist aber zu berücksichtigen, daß sich die Fibrine im allgemeinen in verdünnten Säuren auch spontan lösen. Diese Eigenschaft ist bei den verschiedenen Tierarten verschieden. Am resistentesten gegen 5‰ Salzsäure ist das Rinderfibrin, das sich deshalb für die Färbung am besten eignet. Die Löslichkeit des Fibrins in Salzlösungen ist eine bekannte Tatsache. Bei der Verwendung von Fibrin als Reagens auf Proteasen sind diese Verhältnisse nicht aus dem Auge zu lassen und stets zu berücksichtigen. Übrigens ist die Empfindlichkeit desselben im Vergleich zu der der Gelatine wesentlich geringer. Für Ochsenfibrin gibt Fermi an, daß es nur noch Trypsin in einer Verdünnung von 1 : 8000 anzeigt. Es besitzt aber den Vorteil, die Enzymwirkung bequem bei Temperaturen über 30° C studieren zu können.

Fermi hat nun Alkalialbuminate auf ihre Verwendung zum Nachweis von proteolytischen Enzymen untersucht. Die Alkalialbuminate wurden durch Mischen von Eiereiweiß oder Blutserum mit Ammoniak, 20 proz. Natriumkarbonatlösung oder 10 proz. Kaliumhydratlösung und nachherigem Erhitzen auf 70° C erhalten. Es konnten nur die noch gut erstarrungsfähigen Alkalialbuminate in Frage kommen. So erhielt Fermi nach Zugabe von 20—40 Proz. Ammoniak zu dem mit Karbolsäure versetzten und filtrierten Eiereiweiß nach dem Erhitzen ein durchsichtiges und festes Produkt, auf das Trypsinlösungen sehr gut wirkten. Weniger empfindlich waren die durch Zufügen von 0,5—1 Proz. Kaliumhydroxyd oder 10 - 16 Proz. Natriumkarbonat hergestellten Alkalialbuminate des Eiereiweißes. Auch die mit den genannten Alkalien erzeugten Alkalialbuminate des Blutserums vom Ochsen erwiesen sich den proteolytischen Enzymen gegenüber empfindlicher als das erstarrte Blutserum. Frisches Blutserum mit 15—20° Ammoniak gemischt und durch eine halbe Stunde einer Temperatur von 70—72° C ausgesetzt, ergibt eine

durchsichtige Gallerte. Auch Kaliumhydroxyd im Verhältnis von 0,5 bis 1,5 Proz. zugesetzt, bewirkt das gleiche. Wird an Stelle des Ochsenblutserums Schweineblutserum verwendet, erniedrigen sich die Alkalidosen sehr bedeutend, da beispielsweise nur ein Zusatz von höchstens 5 Proz. Ammoniak noch nicht das Erstarrungsvermögen beeinträchtigt. Dabei ist die Empfindlichkeit für Trypsin geringer, als bei dem gleich hergestellten Alkalialbuminat des Ochsenblutserums. Es soll übrigens ein 24stündiger Aufenthalt der Alkalieiweißmischung bei 30° C vor der Gerinnung bedeutend die gleichmäßige Erstarrung begünstigen und die Verflüssigung erleichtern.

Erstarrtes Blutserum allein wird von vielen Bakterien verflüssigt und kann ebenfalls zum Nachweis von proteolytischen Enzymen verwendet werden; doch seine geringe Empfindlichkeit macht es nicht besonders wertvoll für diesen Zweck. Auch Verdünnungen des Blutserums mit Wasser, die ohne erhebliche Störung im Gerinnungsvermögen bis aufs doppelte Volumen ausgeführt werden können, vergrößern die Empfindlichkeit kaum.

Auch in der Hitze koaguliertes Eiereiweiß wird vielfach als Reagens auf proteolytische Enzyme empfohlen. Man läßt größere Mengen davon in der Hitze erstarren und schneidet daraus Würfel, die man dann in die Enzymflüssigkeit einlegt. Bei der Anwesenheit von Proteasen werden sie durchscheinend und lösen sich auf. Auch zu quantitativen Versuchen eignet sich koaguliertes Eiereiweiß wenigstens bis zu einem gewissen Grade, wenn es nach dem Vorgang von Mett in 1—2 mm weite Glasröhrchen aufgesaugt und dort koaguliert wird. Diese mit erstarrtem Eiweiß beschickten Röhrchen werden in die Enzymlösung eingelegt und im Brütofen gehalten. Die nach gewissen Zeiten weggelöste Eiweißmasse mißt man in Millimetern. Koaguliertes Eiereiweiß hat sich aber als wenig empfindliches Reagens auf Trypsin herausgestellt.

Fermi gibt uns über die Empfindlichkeit der verschiedenen als Reagenzien auf proteolytische Enzyme zumeist verwendeten Substanzen eine Zusammenstellung, der die Einwirkung von verdünnten Trypsinlösungen zugrunde gelegt ist. Danach vermögen folgende Körper Trypsin in folgenden Verdünnungen noch deutlich anzuzeigen:

Reagens:	Noch wirkende Trypsinverdünnung
1. Gelatine 2—3 Proz. mit Na_2CO_3 2 Proz. alkalisiert.	
Methode der Röhrchen mit fester Gelatine . .	1 : 1400000
„ „ „ „ verflüssigter Gelatine	1 : 1000000
2. Rinderfibrin	1 : 8000
3. Ochsenblutserum mit Ammoniak	1 : 5000
4. Kasein	1 : 1000 — 1 : 5000
5. Erstarrtes Ochsenblutserum	1 : 1000
6. Verdünntes Ochsenblutserum	1 : 1000
7. Kaninchenmuskel	1 : 1000
8. Eiereiweiß mit Ammoniak	1 : 800
9. In der Hitze koaguliertes Eiereiweiß	1 : 500

Wir haben noch des Kaseins als Reagens auf proteolytische Enzyme zu gedenken. Man macht bei den meisten Gelatine verflüssigenden Bakterien die Beobachtung, daß sie bei der Zucht in Milch das Kasein derselben zumeist zuerst fällen und dann eine allmähliche

Aufhellung der Milchkultur herbeiführen. Es liegt zwar die Annahme nahe, daß die zuerst von den Mikroben produzierte Säure die Kaseinfällung verursacht und die weiterhin gebildete Säuremenge eine Wiederauflösung desselben bewirkt. Es ist ja eine bekannte Tatsache, daß verdünnte Säuren das Kasein fällen und bei stärkerer Konzentration dasselbe wieder lösen. Daß dem nicht so ist, zeigt die Beobachtung, daß die bakterielle Kaseinlösung auch in neutralen Substraten stattfindet und daß Kulturfiltrate neutralisiert dasselbe ausführen und diese Fähigkeit durch Erhitzen verlieren. Damit scheint es erwiesen, daß proteolytische Enzyme diese Lösungen vollziehen und daß es möglich ist, mit Kasein proteolytische Enzyme nachzuweisen. Für die Aufnahme des Kaseins in Suspension erwies sich nun nach den Untersuchungen von Eijkman der Agarnährboden als besonders zweckmäßig. Danach mischt man sterilen Agarnährboden mit durch Zentrifugieren erhaltener Magermilch im Verhältnis von 1 : 3—1 : 6. Die Mischung geschieht unmittelbar vor dem Gebrauch, indem man Agargallerte im siedenden Wasserbad verflüssigt, etwas abkühlen läßt, hierauf mit der entsprechenden Menge sterilisierter Magermilch mischt, gut durchschüttelt und dann zu Platten in Petrischalen ausgießt. Bei der Zucht auf diesen Platten diffundiert das proteolytische Enzym der betreffenden Bakterienarten, sofern sie ein solches erzeugen, in den Nährboden und lösen das darin suspendierte Kasein, was sich durch eine Aufhellung der früher getrübten Agarmasse kundgibt. Statt der lebenden Kolonien kann man selbstverständlich auch Kulturfiltrate auftropfen oder in poröse Körper einsaugen und diese dann auf die Milchagarplatte auflegen. Ebenso kann ein Desinfiziens, wie Thymolwasser, zugesetzt werden, analog, wie es für die Methode der Gelatineplatten zum Nachweis von Proteasen auf Seite 26 dargestellt wurde.

Statt Agar mit Magermilch zu versetzen, kann man auch rein dargestelltes Kasein verwenden. Die Milchagarmethode bietet in bezug auf die Empfindlichkeit keine Vorteile. Sie hat nur insofern eine Annehmlichkeit, als man bei höherer Temperatur mit ihr arbeiten und auch noch bei sehr geringen Substanzmengen eine qualitative Bestimmung von proteolytischen Enzymen ausführen kann. Verfügt man über größere Quantitäten von Enzymlösungen, kann man Würfelchen von Milch- oder Kaseinagar in die Fermentlösungen einlegen und an der Aufhellung derselben die Anwesenheit kaseinlösender Enzyme feststellen.

Es wurden zur Prüfung von proteolytischen Enzymen noch andere Substanzen verwendet, die gelegentlich der Besprechung der einschlägigen Versuche Erwähnung finden werden.

Für quantitative Enzymversuche wurden meistens die gelösten Gelatinemengen als Maß für die Enzymwirkung gebraucht. Wurde aber Fibrin oder erstarrtes Serum u. dgl. als Reagens verwendet, so kann die Menge der gelösten Substanz auch auf chemischem Wege bestimmt werden. Man hat nur nötig, nach den üblichen Stickstoffbestimmungsmethoden die Menge des Stickstoffes der gelösten Stickstoffverbindungen vor und nach dem Versuche zu bestimmen. Aus der Zunahme derselben während der Enzymwirkung kann auf die Größe der letzteren geschlossen werden.

Viel einfacher gestaltet sich die Verfolgung der Spaltungsvorgänge bei der Enzymwirkung durch die Anwendung physikalischer Methoden, die sich überdies durch große Empfindlichkeit auszeichnen (vgl.

Henri und Larguier des Bancels). Für die Untersuchung der Bakterienenzyme auf ihre Wirksamkeit fanden sie bisher viel zu wenig Beachtung. Vor allem kommen hier die optischen Methoden in Betracht. Das Drehungsvermögen der gebildeten optisch aktiven Peptone kann als Maß für deren Menge verwendet werden. Daraus ist wieder der Schluß auf die Größe der Enzymwirkung möglich. So wurde das Gesetz der Pepsinwirkung gefunden, die Abhängigkeit der gebildeten Spaltungsprodukte von der Emulsinmenge bei dessen Wirkung auf Arbutin und Koniferin bestimmt. Durch polarimetrische Messungen wurde bei zahlreichen Untersuchungen über die Eiweißspaltung durch Pepsine, Trypsine und Säuren der Verlauf derselben verfolgt (Lawrow, Siegfried, Gamgee und Jones, Gamgee und Croft Hill).

Abderhalden und Koelker untersuchten die Einwirkung von Trypsin und Pepsin auf optisch aktive Polypeptide und bestimmten die Wirkung auf polarimetrischem Wege. Es ist nur zu wünschen, daß ähnliche Untersuchungen auch mit Bakterienproteasen ausgeführt werden, zumal bei den bisherigen Untersuchungen das Ausgangsmaterial mehr oder weniger unbekannt war und die Zusammensetzung des Agens Enzym noch völlig in Dunkel gehüllt ist. Durch die Verwendung der Polypeptide Fischers ist wenigstens die eine Unbekannte, das Ausgangsmaterial, zu einer chemisch charakterisierten Verbindung geworden.

Die Anwendung des Polarisationsapparates beim Enzymstudium ist einfach, denn in den vollständig geschlossenen Beobachtungsröhren kann der Ablauf der Reaktion vom Anfang bis zum Ende ständig verfolgt werden, zumal die Infektion durch Bakterien mit Toluol ohne Einfluß auf das Drehungsvermögen vollständig sicher auszuschalten ist.

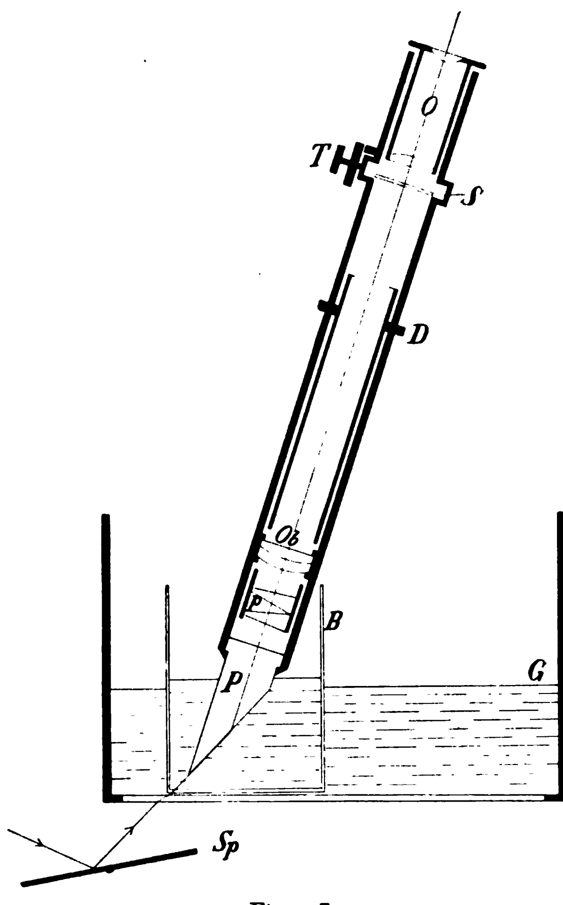
Die Einrichtung der Polarisationsapparate bedarf keiner näheren Erörterung, da diese Apparate sozusagen in keinem Laboratorium fehlen.

Kurz erwähnt sei auch das von Klug versuchte spektrophotometrische Verfahren, das auf der vergleichenden Farbenänderung der Biuretrektion fußt.

Wohl das einfachste und dennoch in der biologischen Forschung nur sehr wenig benutzte Verfahren zur Ermittelung von Umsetzungen und Konstitutions- und Lösungsänderungen ist die Bestimmung des Brechungsvermögens. Dazu eignet sich am besten das Pulfrich'sche Eintauchrefraktometer der Firma Zeiß in Jena. Da dieses Instrument noch verhältnismäsig wenig verwendet wird, sei dessen Einrichtung kurz skizziert.

Durch das Brechungsvermögen der zu untersuchenden Flüssigkeit wird das parallel zur Prismenfläche, also streifend einfallende Licht mehr oder minder in das Prisma eintreten und einen entsprechenden Teil des Gesichtsfeldes erhellen. Der Winkel, den der Grenzstrahl mit der eingetauchten Prismenfläche einschließt, gibt uns ein Maß für den Brechungsquotienten der untersuchten Flüssigkeit. Mit der Zunahme bezw. Abnahme dieses Winkels ist eine veränderte Lage der Grenzlinie zwischen hell und dunkel verbunden, deren Lage an einem Maßstab durch eine Lupe abgelesen wird. Zu dem Instrument gehören Tabellen, aus denen die den Ablesungen entsprechenden Brechungsindizes zu entnehmen sind. In Figur 7 ist die Einrichtung des Eintauchrefraktometers von Zeiß schematisch dargestellt. Im wesentlichen besteht es aus einem stark lichtbrechenden Glaskörper von Zylinderform mit einer in die Flüssigkeit ein-

tauchenden polierten schrägen Schlifffläche. Dieser Glaskörper P ist in eine vernickelte Metallfassung eingekittet. Die Fassung trägt noch ein Fernrohr von ungefähr zehnfacher Vergrößerung mit dem Objektiv Ob und dem in Schneckengangführung verschiebbaren Okular O. Letzteres wird auf die Teilstriche der Skala S durch diese Verschiebung scharf eingestellt. Die Skala ist durch die Schraube T ebenfalls senkrecht zur Grenzlinie zwischen dunkel und hell verschiebbar, so daß ein Teilstrich der Skala mit derselben zusammenfallend eingestellt werden kann. Die Schraube trägt am Umfang eine Teilung, die an einem Zeiger spielt und die genaue Ablesung der Bruchteile der Entfernung zweier Skalenteile in Zehnteln gestattet. Hundertel können noch gut geschätzt werden. Da bei Verwendung von nicht monochromatischem Licht infolge der verschiedenen Dispersion der zu untersuchenden Flüssigkeiten die Grenzlinie zwischen hell und dunkel von farbigen Säumen umgeben ist, befindet sich zur Aufhebung dieser Erscheinung ein Kompensator p zwischen der inneren Prismenfläche und dem Fernrohrobjektiv. Dieser besteht aus einem dreiteiligen Amici'schen Prisma, das durch den Ring D um die optische Achse drehbar eingerichtet ist. An dem Drehring D befindet sich eine willkürliche Teilung, die an einer Marke vorübergeführt wird. Die für die Aufhebung der Dispersionserscheinungen gemachte Drehung kann zahlenmäßig abgelesen werden und die erhaltenen Werte können als relative Vergleichszahlen verwertet werden. Für den Gebrauch wird das Refraktometer in die zu untersuchende Flüssigkeit eingetaucht. Verfügt man über genügende Flüssigkeitsmengen und ist die Flüssigkeit nicht sehr rasch verdunstend, so füllt man sie in ein kleines Becherglas B, das nun samt dem Inhalt in einem größeren Wasserbad G auf einer bestimmten Temperatur erhalten wird. Für die unmittelbare Vergleichung der erhaltenen Werte ist es von der größten Wichtigkeit, die Beobachtungstemperatur immer auf Zehntelgrade genau gleich zu erhalten. Der Boden



Figur 7.

des Temperiergefäßes G ist von Glas. Unten trägt es einen horizontal drehbaren Spiegel Sp zum Regeln des streifenden Lichteinfalles. Das Gefäß G besitzt noch verschiebbare Stützen und eine Drahtgabel zum Einhängen des Refraktometers. Im Schema sind dieselben weggelassen. Für die Untersuchung von flüchtigen Lösungen und von geringen Flüssigkeitsmengen kommt eine Kappe zur Verwendung, die über den Glaskörper gestülpt und durch einen Bajonettverschluß dicht an die Fassung angepreßt wird. Das Fenster dieser Kappe läßt sich ebenfalls durch einen Bajonettverschluß dicht anfügen und entfernen. Diese Kappe kann entweder direkt mit der zu untersuchenden Flüssigkeit gefällt werden oder dient zur Befestigung eines Hilfsprismas, das auf die polierte Fläche aufgesetzt wird. Ein Tropfen der Flüssigkeit zwischen die beiden Flächen gebracht genügt, die Messung durchführen zu können.

Für die Untersuchung der Vorgänge bei Enzymversuchen ist es am besten, eine niedrige Beobachtungstemperatur zu wählen. Dies trifft besonders bei Vergleichsversuchsreihen zu. Man verwendet zweckmäßig Reagenzgläser zur Ausführung der Enzymversuche, in die man als angreifbare Substanz Fleischbrühe oder Peptonlösungen einfüllt und Kulturfiltrate zusetzt. Zur Hintanhaltung von Bakterieninfektionen genügt es, die Fleischbrühe oder die Lösungen mit Thymol zu sättigen. Unmittelbar nach dem Zufügen der enzymhaltigen Filtrate zu den Proben stellt man sie in ein Wasserbad mit höchstens 10° C und erhält das Wasser des Temperiergefäßes ebenfalls auf dieser Temperatur. Dies erreicht man durch direkten Anschluß an die Wasserleitung. Zur Untersuchung des Brechungsindex befestigt man die Kappe durch Anziehen des Bajonettverschlusses an der Refraktometerfassung, öffnet den Glasdeckel derselben und füllt mit dem Enzymgemisch voll. Dann setzt man den Glasdeckel dicht auf und stellt im Wasserbad ein, indem man zuerst durch Drehen des Ringes D den farbigen Saum der Grenzlinie entfernt und dann durch Stellung des Spiegels einen gleichmäßig hellen und dunklen Gesichtsfeldteil mit scharfer Grenzlinie bekommt. Sobald sich die Einstellung der Grenzlinie auf einen Teilstrich nicht mehr ändert, liest man endgültig ab. Dann enfernt man das Kappengefäß und füllt den Inhalt zurück in das Proberöhrchen und beläßt es weiter im Kältebad bei ungefähr 10° C. Durch Wasserspülung ist das Refraktometer und das Gefäß zu reinigen und mit einem weichen Lappen zu trocknen und die nächste Probe einzufüllen. Erst wenn sämtliche Proben refraktomiert sind, bringt man sie in den Brütschrank mit 30—35° C, worin sich alsbald die Einwirkung der Proteasen einstellt. Nach bestimmten Zeiten werden wieder alle Proben gleichzeitig aus dem Brütschrank genommen und vor der Untersuchung mit dem Refraktometer gekühlt. Sehr wirksame Bakterienproteasen ändern schon innerhalb $^1/_2$ Stunde den Brechungsexponenten von Peptonlösungen, wenn die Temperatur 18—22° C beträgt, dagegen nicht bei niederer Temperatur. Durch das Kältebad wird also die Enzymwirkung zeitweise ausgeschaltet, bezw. soweit vermindert, daß eine Vergleichung der erhaltenen Werte für bestimmte Zeiten möglich wird. Hat man das Kulturfiltrat mit Toluol behandelt, so muß dieses mit einem durchgeleiteten feuchten Luftstrom entfernt werden. Für refraktometrische Enzymuntersuchungen empfiehlt sich daher besser der Zusatz von Thymol, das nicht entfernt zu werden braucht. Man kann für hinreichend genaue Beobachtungen das von einer weißen Fläche reflektierte Tageslicht ge-

brauchen, doch schärfere Ablesungen und dementsprechend genauere Ergebnisse erzielt man durch Verwendung von Natriumlicht. So wie bei polarimetrischen Messungen muß auch bei den refraktometrischen Bestimmungen für alle Proben peinlichst genau die gleiche Temperatur eingehalten werden, da schon wenige Zehntel von Graden eine nennenswerte Änderung im Ergebnis herbeiführen.

Auch kryoskopische Untersuchungen wurden zur Feststellung der Veränderungen in spaltbaren Lösungen durch Enzyme verwendet, erwiesen sich aber als nicht genug empfindlich. Bessere Resultate lieferten Bestimmungen der elektrischen Leitfähigkeit.

Mit Hilfe des Ostwald'schen Viskosimeters kann die Proteolyse an der mit der Abnahme der Koagulierungsfähigkeit einhergehenden Verringerung der inneren Reibung, der Viskosität, festgestellt werden. Bei Pepsinversuchen hat sich nach Spriggs herausgestellt, daß die Abnahme der Viskosität mit dem Verschwinden koagulabler Eiweißkörper ihr Ende erreicht.

In Gleichgewichtszustände zwischen Enzym und spaltbarer Substanz vor und nach eingetretener Reaktion geben uns Bestimmungen der Wärmetönung einen Einblick, wie sie Fuld für die Labwirkung statuierte.

Die chemisch-physikalischen Methoden wurden zur Erforschung der Bakterienenzymwirkung nur sehr wenig angewendet, können aber naturgemäß ohne weiteres auch auf dieses Gebiet erstreckt werden. Dadurch würde gewiß mancher Fortschritt in der Lehre von den Bakterienenzymen erreicht werden.

V.

Fortsetzung der proteolytischen Bakterienenzyme.

Bakterien-Proteasen.

Proteolytische Enzyme nach dem Typus des Trypsin finden sich im Reich der Bakterien sehr weit verbreitet. Sie verraten ihre Anwesenheit gewöhnlich schon dadurch, daß bei der Zucht vieler Bakterien in der Gelatinestichkultur die Gelatine mehr oder weniger schnell verflüssigt wird. Diese Verflüssigung ist aber nicht auf eine unmittelbare Lebenstätigkeit der Mikroorganismen zurückzuführen, sondern auf Stoffe, die allerdings von der lebenden Zelle in verschiedener Menge gebildet und teils in das umgebende Medium abgegeben oder in der Zelle größtenteils zurückgehalten werden. Die Produktion dieser Stoffe, der Proteasen, ist nun bei den einzelnen Mikroorganismen höchst verschieden. Schon der große Unterschied im Verflüssigungstrichter der Gelatinekulturen gibt dafür einen Fingerzeig. Zu ebenso verschiedenen Ergebnissen gelangt man, wenn man die Enzymwirkung unter Ausschaltung der Tätigkeit der lebenden Zelle untersucht. Fermi und Pernossi haben zu dem Zwecke verflüssigte Gelatinekulturen, die durch Karbolsäure desinfiziert wurden, in der Menge von 5 cm^3 auf Karbolgelatine geschichtet und die Höhe der Verflüssigung nach 5tägiger Versuchsdauer in Millimetern gemessen. Dabei ergaben sich für die proteolytische Wirkung der abgetöteten Kulturen von verschiedenen Mikroben folgende Werte:

Vibrio Massauae	6	mm
Vibrio Finkler-Prior	10	„
Bacillus Milleri	7	„
Vibrio Deneki	5	„
Vibrio Metschnikowii	7	„
Bacillus prodigiosus	5	„
Bacillus anthracis	3	„
Bacillus indicus	17	„
Bacillus tetani	8	„
Bacillus pyocyaneus	5	„

Aus dieser Zusammenstellung ersieht man, daß die proteolytische Kraft der einzelnen getöteten Kulturen in der Tat wesentlich verschieden ist. Diesen Zahlen darf man allerdings keine zu große Bedeutung beilegen,

da in diesen Kulturen wohl sicherlich nicht überall die gleiche Anzahl von Bakterien vorhanden war. Es ist ja einzusehen, daß mit zunehmender Bakterienzahl, bezw. ansteigender Vermehrungsgeschwindigkeit, auch die Bildung der Proteasen unter sonst gleichen Umständen zunehmen muß. Um nun untereinander brauchbare Vergleichswerte aus der Verflüssigungshöhe zu erhalten, müßte von derselben Menge Bakterien ausgegangen werden, was unter den genannten Versuchsbedingungen nicht durchführbar ist. Schon die Gelatine, als Nährsubstrat verwendet, hindert die Züchtung oberhalb des Schmelzpunktes, sobald man sie als festen Nährboden benützen will. Da aber das Temperaturoptimum für die verschiedenen Bakterienarten verschieden ist und die Gelatinekulturen nur bei ungefähr 22° C gehalten werden, so sind nur für eine beschränkte Anzahl von Mikroben optimale Bedingungen in Bezug auf die Temperatur geschaffen. Alle anderen Bakterienarten finden ungünstigere Bedingungen, werden sich weniger vermehren und mithin auch geringere Quantitäten von Proteasen bilden. Das Gleiche gilt in Bezug auf das Alkaleszenzoptimum, das für die verschiedenen Mikroorganismen ebenfalls innerhalb weiter Grenzen liegt. Bei der Berücksichtigung dieser Verhältnisse können also diese Zahlen nicht für weitergehende Schlüsse gebraucht werden. Deshalb können Bakterienarten auch nicht auf Grund der Menge der von ihnen erzeugten proteolytischen Enzyme ohne weiteres unterschieden werden.

Die Bildung der Proteasen in merkbarer Menge ist keineswegs eine dauernde Eigenschaft von Bakterienzellen, eine lebenswichtige Funktion derselben.

Bei ein und derselben Bakterienart unterliegt die Menge der gebildeten Proteasen großen Schwankungen und ist von einer Reihe äußerer Faktoren abhängig. So behindert Zuckerzusatz zu den Kulturen in erheblichem Maße gerade die Bildung von Proteasen. Jede Zuckerart wirkt in dieser Hinsicht nicht gleich. Milchzucker setzt die Erzeugung der Proteasen nur sehr geringfügig herab, während Dextrose in größeren Dosen dieselbe vollständig unterdrücken kann trotz üppigen Wachstumes der betreffenden Bakterienart. Im allgemeinen sind der Produktion der Proteasen alle Kohlenhydrate mehr oder weniger hinderlich. Es liegt nun nahe, den gebildeten Säuren einfach eine Behinderung der Enzymwirkung zuzuschreiben. Diese Annahme kann aber als widerlegt betrachtet werden, denn der Zusatz von Zucker oder Kohlenhydraten in gleichen Dosen, wie sie Behinderung der Bildung der Proteasen in Kulturen ohne besondere Beeinträchtigung des Wachstums erzeugen, zu bereits enzymhaltigen Substraten hebt die Wirkung nicht auf, sobald man die für die Enzymwirkung passende Reaktion herstellt. Wenn auch durch die Säuren eine Behinderung der Wirkung eingetreten ist, so kann durch Abstumpfung derselben die Enzymtätigkeit wieder hergestellt werden. Waren aber die Kulturen mit Dextrose angelegt, dann hatte eine nachträgliche Neutralisation oder die fortdauernde Bindung der gebildeten Säuren durch ein kohlensaures Salz u. dgl. keine Wirkung; die Leimlösung blieb aus. Schon diese einfachen Versuche zeigen zur Genüge, daß gewisse Kohlenhydrate nicht die Enzymwirkung aufheben, sondern die Enzymbildung (Auerbach). Auch eine Reihe anderer Stoffe kann die Enzymbildung erheblich einschränken oder gänzlich unterdrücken, ohne das Wachstum auszuschließen.

So entwickelt sich Bacillus prodigiosus in Nährbouillon mit einem Zusatz von 0.5 Proz. Morphium, Strychnin oder Antipyrin noch gut. Proteolytisches Enzym konnte jedoch nur in den Kulturen mit Morphium nachgewiesen werden. Bacillus pyocyaneus wächst mit den genannten Zusätzen oder mit beigegebenem Chinin gut, vermag aber sein proteolytisches Enzym sowohl bei Morphium- als auch bei Strychnin und Antipyrinzusatz zu produzieren und wird darin nur vom Chinin gehindert Der Vibrio cholerae gedeiht auf Bouillon mit einem 0.5proz. Zusatz von Morphin oder Antipyrin, erzeugt seine Protease aber nur in dem morphinhaltigen Nährsubstrat. Geringe Mengen von Karbolsäure behindern den Choleravibrio ebenfalls in der Enzymproduktion, ohne sein Wachstum zu unterdrücken.

Die Bakterien bilden im allgemeinen ihr proteolytisches Enzym am besten auf eiweißhaltigen Nährsubstraten, so in Fleischwassergelatine, Nährbouillon, Nähragar usw. Versuche an einzelnen Bakterienarten mit eiweißfreien Nährböden haben zwar einige Ausnahmen ergeben.

Fermi[1]) verwendet zu solchen Untersuchungen folgende Nährsalzlösung:

Ammonsalz	0.5 — 1.0	g
Saures phosphorsaures Kali . . .	0.5	„
Dreibasisch phosphorsaurer Kalk .	0.05	„
Magnesiumsulfat	0.5	„
Glyzerin (oder Rohrzucker) . . .	50.0	„
Wasser	1000	cm^3

Von neun untersuchten Bakterienarten entwickelten sich darin bei Verwendung von Ammonphosphat sehr gut Bacillus prodigiosus, Bacillus pyocyaneus und Bacillus Fitzianus. Ein proteolytisches Enzym entwickelten nur Bacillus prodigiosus und Bacillus pyocyaneus, wenn Glyzerin als Kohlenstoffquelle zu Gebote stand. Wurde an Stelle von Glyzerin 1 Proz. Mannit oder Laktose als Kohlenstoffquelle dargereicht, dann entwickelten sich ebenfalls beide letztgenannten Bakterienarten, doch nur Bacillus prodigiosus produzierte in beiden Fällen die Protease, während Bacillus pyocyaneus mit Mannit allein sein Enzym bildete.

Auch Glukoside verhindern meistens die Produktion von proteolytischen Enzymen. Wird in der früher angegebenen Nährsalzlösung der Zucker durch 1 Proz. Salizin, Amygdalin, Saponin, Jalapin, Äsculin, Arbutin oder Inulin ersetzt, so vermag sich Bacillus prodigiosus nur bei Gegenwart von Salizin, Inulin, Amygdalin und Saponin zu vermehren, Bacillus pyocyaneus nur mit Amygdalin und endlich Bacillus subtilis nur mit Salizin, Inulin und Saponin. Die Bildung einer Protease war jedoch nur beim Wachstum des Bacillus subtilis auf der anorganischen Nährlösung mit Saponin zu verzeichnen. Wurde an Stelle des Ammonsalzes als Stickstoffquelle Acetamid, Propylamin oder Asparagin dargereicht, fand nur bei der Entwicklung des Bacillus pyocyaneus eine spurweise Produktion des proteolytischen Enzymes statt. Die Zugabe von Alkaloiden zur genannten Nährlösung verhinderte das Wachstum und damit natürlich die Enzymbildung.

---

[1]) Fermi, Arch. f. Hyg. Bd. 14, 1892.

Aus allen Versuchen geht im wesentlichen hervor, daß die Anwesenheit von Eiweißstoffen für die Bildung der Bakterienproteasen mit wenigen Ausnahmen unbedingt notwendig ist.

Auch die Züchtung von Mikroorganismen unter lebensfremden Bedingungen, kann die Proteasenbildung wesentlich herabsetzen und Bakterien dieser Fähigkeit gänzlich berauben. In jedem bakteriologischen Laboratorium empfindet man es als große Unannehmlichkeit, daß länger fortgezüchtete Choleravibrionen allmählich die Gelatineverflüssigung vollkommen einstellen und deshalb in ihrem Wachstum auf Gelatineplatten viel von ihrem typischen Aussehen verlieren. Es gelingt erst durch Schaffung besonderer Wachstumsbedingungen und mitunter sehr schwierig, sie wieder zur Gelatinelösung anzuregen. Das gleiche gilt vom Bacillus anthracis[1]), der in frisch herausgezüchtetem Zustande sehr kräftig die Gelatine verflüssigt. Allmählich vermindert sich diese Eigenschaft und kann erst durch Ueberimpfungen in kurzen Zeitintervallen und Zucht bei 37° C wieder gewonnen werden. Es soll übrigens bei Bacillus fluorescens liquefaciens vorgekommen sein, daß er die Bildung der Protease dauernd verlor und sich in nichts mehr vom Bacillus fluorescens non liquefaciens unterschied.

Die Bildung der wirksamen trypsinähnlichen Bakterienfermente scheint ebenso zu geschehen, wie die Pankreastrypsinbildung. Im Pankreas ist kein wirksames Trypsin enthalten. Hier entsteht eine unwirksame Vorstufe desselben, ein Zymogen, das erst durch die Wirkung anderer Agentien in die wirksame Form übergeführt wird. So enthält der Darmsaft einen Stoff, der sich quantitativ, ohne Veränderungen herbeizuführen, an Fibrin bindet und Enterokinase[2]) genannt wird. Durch die Enterokinase, die selbst kaum den Enzymen zuzurechnen ist, wird das Zymogen des Trypsins in das Trypsin übergeführt. Bei den Bakterien sind wir nach den Untersuchungen von Delezenne[3]) in der Lage, ebenfalls eine Enterokinase nachzuweisen. Es gibt, wie wir später sehen werden, gelatineverflüssigende Bakterienarten, deren proteolytische Enzyme auf Fibrin, bezw. Albumin nicht zu wirken vermögen. Werden nun solche Mikroben auf Pankreassaft gezüchtet und diese mit Toluol desinfizierten Kulturen auf Albumin wirken gelassen, so findet eine Proteolyse desselben statt. Die Bakterien vertreten hier die Darmenterokinase oder besser gesagt, sie bilden eine Enterokinase. Auch das Filtrat der Bouillonkulturen von Bacillus subtilis, Bacillus mesentericus vulgatus, Vibrio Finkler und Prior und einiger anderer Bakterienarten enthält eine Enterokinase oder kurzweg Kinase, die das Zymogen des Pankreassaftes in das aktive Enzym überzuführen vermag. Dies legt die Vermutung nahe, daß in den Bakterienzellen ebenfalls eine unwirksame Vorstufe des proteolytischen Enzymes gebildet wird, die dann durch eine Kinase in die wirksame Protease übergeht.

Bei der Bakterienproteasenwirkung scheint es übrigens auch zu einer vorübergehenden Bindung zwischen Enzym und zu

---

1) Vgl. Matzuschita, Zentralbl. f. Bakt., I. Abt., Orig., Bd. 28, 1900.

2) Über Enterokinase vor allem die Arbeiten von Delezenne, Compt. rend. de la soc. de biologie, Paris, Bd. 53, 54 u. 55, 1901—1903.

3) Delezenne, C., Compt. rend. de l'Acad. Paris, I. 135.

spaltender Substanz zu kommen, wie der folgende einfache Versuch zeigt. Wenn man in das Kulturfiltrat einer Protease bildenden Bakterienart, z. B. Bacterium panis, kleine Stückchen gekochten Fibrins bringt, in der Kälte einige Stunden stehen läßt und dann die Stückchen durch mehrere Stunden in fließendem Wasser auswäscht, so bewirken diese behandelten Stückchen eine Lösung der Thymol-Gelatineplatte. Nur gewässerte Kontrollproben von Fibrin vermögen dies nicht. Es wird also das Enzym in der Kälte an Fibrin fest gebunden und kann dann wieder auf Gelatine wirken. Bringt man diese vorbehandelten Fibrinflocken in Thymolwasser in den Thermostaten, so findet eine Lösung derselben statt. Außerdem hat das mit Fibrin behandelte Kulturfiltrat sehr wesentlich an proteolytischer Wirksamkeit eingebüßt, was die einfache Untersuchung mit den Gelatineröhrchen von Fermi ergibt.

Wie die Untersuchungen von Martin Jacoby[1]) ergeben, wird auch das Trypsin aus Trypsinlösungen durch Fibrinflocken sehr fest verankert.

Die proteolytischen Bakterienenzyme richten ihre Tätigkeit gegen Eiweißstoffe. Sie beschleunigen den Zerfall der verschiedenen Eiweißstoffe aber sehr verschieden. Das native Eiweiß leistet dabei den größten Widerstand. Es ist sehr fraglich, ob lebendes Eiweiß überhaupt durch Proteasen angegriffen wird. In denaturiertem und koaguliertem Zustand sind die Eiweißstoffe viel leichter spaltbar. Nach Pick und Joachim wird bei der Fäulnis des Blutserums am raschesten das Euglobulin zersetzt. Eingehende Untersuchungen über die Wirkungsweise von Bakterienproteasen auf die verschiedenen Eiweißsubstanzen unter Ausschluß der lebenden Zellen sind leider nicht angestellt. Dafür liegen aber um so zahlreichere Untersuchungen über die bakterielle Eiweißfäulnis, bei der gewiß die proteolytischen Enzyme eine hervorragende Rolle spielen, aber sicherlich nicht allein den tiefen Zerfall bis zu stickstofffreien einfachen Verbindungen herbeiführen. Trotzdem gestatten diese Untersuchungen im Zusammenhang mit den Arbeiten über die zellenfreien Eiweißspaltungen durch Kulturfiltrate oder mit abgetöteten Bakterienmassen einen ungefähren Einblick in die Wirkungsweise der Bakterienproteasen.

Emmerling und Reiser untersuchten die von Bacillus fluorescens liquefaciens verflüssigten Gelatinemassen und fanden vornehmlich Leimpeptone und neben freiem Ammoniak Methylamin, Trimethylamin, dann Cholin und Betain. Sie vermißten aber Indol, Skatol, Phenole und Schwefelwasserstoff.

Die soeben genannten Untersucher stellten sich dann eine Emulsion vom Bakterienrückstand größerer Kulturmengen des Bacillus fluorescens liquefaciens in Wasser her und ließen diese bei 37° C auf Blutfibrin unter Zusatz von Toluol einwirken. Hierbei kam es besonders zur Spaltung bis zu Aminosäuren, speziell Arginin.

Aus den Untersuchungen von Fermi[2]) geht bezüglich der chemischen Natur der durch verhältnismäßig reinere Kulturfiltrate und durch Auflösungen von Alkohol gefällten Proteasenlösungen erzeugten Spaltungs-

---

[1]) Jacoby, M., Biochem. Zeitschr. Bd. 2, 1906. Vgl. auch Jacoby, ebendort, Bd. 1, 1906.
[2]) Cl. Fermi, Arch. f. Hygiene, Bd. 10, 1890.

produkte des frischen Fibrins nur soviel hervor, daß die in Lösung gegangenen Fibrinmengen beim Kochen nicht mehr ausfielen und durch Salpetersäure in der Kälte nur teilweise, in der Hitze aber flockig gefällt wurden. Dies deutet ebenfalls auf eine nicht sehr tiefgehende Spaltung hin.

Emmerling[1]) unterzog auch die Zersetzung des Fibrins durch Streptokokken einer Untersuchung. Er ließ unter anderem auch desinfizierte Kulturmassen von Streptococcus longus in einer Wasserstoffatmosphäre durch 3 Wochen auf Fibrin einwirken. Die gelbliche Flüssigkeit wurde dann durch ein Pukallfilter gesaugt und das Filtrat einer genauen Analyse unterzogen. Die Produkte der Zersetzung waren Tyrosin, Leucin, Bernsteinsäure, Essigsäure, Propionsäure, Buttersäure, Pyridinbasen, Ammoniak, Trimethylamin und Methylamin.

In einer anderen Arbeit[2]) berichtet Emmerling über die bei der Fäulnis von Eieralbumin durch Staphylococcus pyogenes aureus erzeugten Abbauprodukte. Diese bestanden im wesentlichen aus Ammoniak, Aminen und Fettsäuren.

Die Proteide des Klebers unterliegen beispielsweise durch die Erreger des Fadenziehens beim Brote einer tiefgehenden Spaltung, die zum Teil gewiß den Proteasen dieser Bakterien zugeschrieben werden muß. Schon Emmerling (l. c. 2) ließ auf Weizenkleber, den er durch Malzauszug von der Stärke befreite, dann auswässerte und endlich mit Alkohol und Äther entfettete, Proteus vulgaris wachsen. Schon nach 4 Tagen setzte eine beträchtliche Gasentwicklung ein. Das Gasgemisch bestand aus

46 Proz. Kohlensäure,
38 „ Wasserstoff,
16 „ Stickstoff.

Nach 6 Tagen entströmte der Kleberkultur starker Fäulnisgeruch und nach 14 Tagen war der Kleber in eine braune, übelriechende Masse umgewandelt, in der die Fäulnisprodukte nachweisbar waren.

Aus den jüngsten Untersuchungen von Abderhalden und Emmerling[3]) über die Spaltung des Gliadins, eines Kleberproteides, durch Bacillus mesentericus vulgatus geht hervor, daß das Gliadin durch die genannte Bakterienart bis zu freien Fettsäuren und weiter zu stickstofffreien Abbauprodukten zerlegt wird. Dieser Vorgang ist aber nicht einheitlich, sondern setzt sich aus zwei Teilen zusammen. Zuerst findet ein Abbau in Aminosäuren statt. Diese werden dann sekundär weiter zerlegt.

Taylor unterzog die Spaltung des Kaseins durch Bacterium coli und durch Proteus vulgaris einer Untersuchung und konnte im ersten Falle nur einen geringfügigen Abbau des Kaseins bis zu Albumosen festsetzen, im zweiten Falle aber eine sehr energische Spaltung, in deren Verlauf höchstwahrscheinlich Histidin und Lysin entsteht.

---

[1]) Emmerling, O., Berichte der deutsch. chem. Gesellsch., Bd. 30, 1897, S. 1863.

[2]) Emmerling, O., Berichte der deutsch. chem. Gesellsch., Bd. 29, 1896, S. 2721.

[3]) Abderhalden und Emmerling, Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. 51, 1907.

Über die proteolytische Spaltung des Kaseins geben uns die eingehenden Untersuchungen von Kalischer mit einer Reihe von aeroben peptonisierenden Milchbakterien Aufschluß. Bemerkenswert ist unter anderem auch der Befund, daß aus dem Kasein bei dessen Spaltung durch diese Milchbakterien kein Indol, Skatol, Phenol und Kresol gebildet wird.

Es gäbe noch eine reiche Fülle von Beispielen der durch Reinkulturen erzielten Eiweißzersetzung, auf die einzugehen zu weit führen würde. Die genannten wenigen Exempel werden genügen, um darzutun, daß die Wirkung der Bakterienproteasen in großen Zügen der tryptischen Eiweißverdauung gleichkommt, wenn auch in einzelnen Fällen ein Unterschied zwischen Bakterienproteasen und Trypsin der höheren Organismen in gewissen Beziehungen festzustellen ist. Wie schon von zahlreichen Forschern nachgewiesen wurde, erzeugen tryptische Verdauungsflüssigkeiten bei der Eiweißspaltung vornehmlich Aminosäuren, die auch bei der Zerlegung der Eiweißstoffe durch proteolytische Bakterienenzyme nachzuweisen sind. Man ist daher berechtigt, bei der Eiweißspaltung durch proteolytische Bakterienenzyme die gleichen Abbauprodukte anzunehmen als bei der tryptischen Verdauung. Durch letztere werden die Eiweißstoffe sehr tief gespalten und auch die Zerlegung von Abbauprodukten noch weiter unterhalten. Dabei entstehen als Zwischenprodukte hauptsächlich zwei Gruppen von Verbindungen, Diaminosäuren (Hexonbasen, Lysin, Arginin, Histidin) und Aminosäuren (Leucin usw.) Außerdem entstehen aromatische Verbindungen, wie Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan, dann wird noch gebildet Ammoniak und Cystin.[1])

Man vermißt zwar die bei der bakteriellen Fäulnis auftretenden tryptischen Riechstoffe Skatol, Indol, Schwefelwasser, Methylmerkaptan usw., was aber nicht wunder nehmen darf, da ja bei der Eiweißfäulnis durch lebende Bakterien eine Reihe von Umsetzungen nebenher und sekundär erfolgen. Im faulenden Gemisch liegen die Dinge sehr kompliziert und es ist mit den größten Schwierigkeiten verbunden, zusammengehörige oder sich auf ein bestimmtes Enzym beziehende Umsetzungen von den sekundären Prozessen glatt zu scheiden und zu erkennen. Es ist bis zu einem gewissen Grade zwar verlockend, die bakterielle Fäulnis mit der Kalischmelze von Eiweißkörpern zu vergleichen, wobei ebenfalls die stinkenden Geruchstoffe Skatol usw. entstehen. Dabei stellen sich manche Analogien heraus, auf die schon Nencki und Kühne hinwiesen. Doch haben wir keinen Grund, an ein der Kalischmelze gleich wirkendes Enzym zu denken, auf das schon Kutscher aufmerksam machte. Bisher gelang es niemals, ein Enzym aufzufinden, das Eiweißstoffe so zersetzt, wie die Kalischmelze. Die Lehre von den Enzymen enthält ohnehin schon genug Hypothesen, so daß es höchst überflüssig erscheint, noch niemals nachgewiesene Enzyme von eigenartiger Wirkung als bestehend anzunehmen und zu behandeln. Wenn auch die Möglichkeit der Existenz eines solchen nicht undenkbar ist, kann man die bei der Eiweißfäulnis obwaltenden Vorgänge doch auf einfachere Weise ungezwungen mit bekannten Erscheinungen erklären. Fassen wir des-

---

[1]) Genaueres nachzulesen bei Oppenheimer, Fermente. Leipzig 1903, S. 132 ff., wo auch die einschlägige Literatur sich findet.

halb die Bakterienproteasen als Enzyme tryptischer Natur auf und setzen die bei der Eiweißfäulnis durch Bakterien entstehenden Produkte, die in den Rahmen einer tryptischen Spaltung nicht passen, auf die Rechnung von sekundären Atmungs- oder Stoffwechselvorgängen, von denen wir zurzeit nicht sicher wissen, ob sie durch andere Enzyme oder das lebende Protoplasma selbst unterhalten werden. Dies ist übrigens für die Erklärung der Wirkungsweise der Bakterienproteasen nebensächlich.

Die proteolytischen Enzyme verschiedener Bakterienarten wirken gegen Fibrin und Leim sehr verschieden. So vermag die Protease von Vibrio Finkler-Prior, Vibrio cholerae, Bacillus Milleri, Bacillus prodigiosus und Käsespirillen u. a. sowohl Fibrin als auch Gelatine zu verflüssigen. Die Fibrinspaltung erfolgt jedoch nur bei leicht alkalischer oder neutraler Reaktion der Enzymlösung, während die Leimpeptonisierung unabhängig von der Reaktion ist, sofern man nicht zu große Säure- oder Alkalimengen zusetzt. Nach Fermi[1]) verlieren die Proteasen des Vibrio cholerae, Vibrio Finkler-Prior, Bacillus prodigiosus und Bacillus pyocyaneus ihre fibrinlösenden Eigenschaften in Gegenwart von 5‰ Salzsäure, ohne die gelatinolytischen Fähigkeiten einzubüßen. Etwas anders verhält sich die Protease des Bacillus anthracis. Diese zeigt sich gegenüber Salzsäure viel empfindlicher und verliert in Gegenwart der oben bezeichneten Menge sowohl das Vermögen der Fibrinlösung als auch der Gelatinepeptonisierung. Ähnlich wie Salzsäure wirken noch eine Reihe anderer Säuren; im allgemeinen am stärksten die Mineralsäuren und am schwächsten die organischen Säuren. So schaltet ein Zusatz von 5 Proz. Karbolsäure- oder von gesättigter Salizylsäurelösung jede Wirkung auf Fibrin bei den Enzymen des Vibrio cholerae, Vibrio Finkler-Prior und Bacillus prodigiosus aus, ohne dagegen der Gelatineverflüssigung hinderlich zu sein. Wir stoßen hier wieder auf Analogien mit dem Pankreastrypsin, das ebenfalls von geringen Säuremengen in der Wirkung auf Fibrin gestört wird. Es erweist sich gegen Salzsäure zwar insofern noch empfindlicher, da es bei Gegenwart von 5‰ Chlorwasserstoffsäure sowohl seine fibrinlösenden als auch seine gelatineverflüssigenden Wirkungen nicht mehr entfalten kann. In Bezug auf das Vorhandensein von organischen Säuren, wie Karbolsäure, Salizylsäure, Essigsäure usw. verhält sich das Trypsin ebenso wie die proteolytischen Enzyme der früher genannten Bakterienarten.

Auch Metallsalze, wie Quecksilberchlorid, verhindern schon in großen Verdünnungen die Fibrinlösung durch proteolytische Bakterienenzyme, während die Gelatineverflüssigung noch weiterhin statthat. Dies gilt nicht nur für die Wirkung der in desinfizierten Kulturen sich vorfindlichen Bakterienproteasen, sondern auch für die Kulturfiltrate, aus denen nachher nach Fermis Vorgang die Bakterienproteasen mit Alkohol gefällt wurden. Selbst verhältnismäßig rein dargestellte proteolytische Enzyme zeigen die gleichen Verhältnisse der Behinderung ihrer Wirkung bei Säuregegenwart, nur sind sie diesbezüglich noch empfindlicher.

Wir finden also also in Bezug auf die Fähigkeit der Fibrinlösung und Gelatineverflüssigung unter den verschiedenen Bakterienproteasen

---

[1]) Fermi, Arch. f. Hyg., Bd. 10, 1890.

Unterschiede, die allerdings mit Vorsicht für eine Verschiedenheit der Bakterienproteasen gedeutet werden können. Es ist doch gewiß auffallend, daß alle Bakterienproteasen Gelatine peptonisieren, nicht aber Fibrin lösen, und daß letztere Eigenschaft durch geringe Salzsäuremengen unterdrückt wird. Bei einiger Überlegung der chemischen Eigenschaften des Fibrins und des Leims kommt man allerdings zur Erklärung, daß vielleicht ein an und für sich schwächer wirksames proteolytisches Enzym deshalb auf Leim noch sehr intensiv zu wirken vermag, weil doch die Gelatine bereits hydratisiertes Kollagen ist, also das erste Produkt einer hydrolytischen Spaltung von Kollagen darstellt. Die bereits eingeleitete Hydratation, durch die der Leim aus dem Kollagen entsteht, wird einfach durch das Enzym beschleunigt und der Leim durch Peptonisierung seiner Erstarrungsfähigkeit beraubt und dauernd verflüssigt. Genügt doch schon einfaches Erwärmen auf 100° C in neutraler Lösung, um die Erstarrungsfähigkeit herabzusetzen. Kollagen, die Ursprungssubstanz ist dagegen für tryptische und proteolytische Spaltung durch Bakterienenzyme noch viel resistenter als Fibrin. Die verschiedene Fähigkeit der einzelnen gelatineverflüssigenden Mikroben, auch Fibrin zu spalten, ist also noch nicht ausreichend für die Unterscheidung mehrerer differenter Bakterienproteasen.

Die Bakterienproteasen zählen wie die übrigen Enzyme zu den thermolabilen Körpern, von denen weitaus die meisten von ihnen im allgemeinen durch kurzandauernde Erhitzung auf die Koagulationstemperatur von Eiweiß zerstört werden. Für die proteolytischen Bakterienenzyme ist zu beachten, daß die von den einzelnen Bakterienarten gebildeten Enzyme eine differente Zerstörungstemperatur besitzen.

Für eine Reihe von Bakterienproteasen bestimmte Fermi[1]) die Zerstörungstemperatur, indem er verflüssigte Gelatinekulturen der betreffenden Mikroorganismen durch 1 Stunde auf 55, 60, 65 und 70° C erwärmte und die proteolytische Kraft derselben nach seiner Methode der festen Gelatineröhrchen unter Desinfektionsmittelzusatz durch Messen der Höhe der verflüssigten Gelatinemenge bestimmte.

Aus der Tabelle von Fermi über diese Versuche sei folgende Zusammenstellung wiedergegeben:

Bakterienart	1 Stunde auf 55° erwärmt. Höhe der Verflüssigung nach 1 Woche in mm:	1 Stunde auf 60° erwärmt. Höhe der Verflüssigung nach 1 Woche in mm:	1 Stunde auf 65° erwärmt. Höhe der Verflüssigung nach 1 Woche in mm:	Kontrolle: nicht erwärmt. Höhe der Verflüssigung nach 1 Woche in mm:
Bacillus Milleri . . .	10	4	0	11
Kieler Bacillus . . .	14	12	4	15
Käsespirillen	6	9	6	9
Bacillus subtilis . . .	3	0	0	4
Bacillus megatherium	3	0	0	6
Staphylococcus pyogenes aureus . .	0	0	0	1
Bacillus fluorescens .	4	0	0	5

Aus dieser Zusammenstellung ergibt sich, daß die proteolytischen Enzyme des Kieler Bazillus und der Käsespirillen die wider-

[1]) Fermi, Arch. f. Hyg., Bd. 14, 1892.

standsfähigsten gegen Hitze sind. Darin stehen ihnen diejenigen von den übrigen untersuchten Bazillen bedeutend nach. Auffallend ist der Befund mit den *Käsespirillen*. Im Vergleich zur proteolytischen Kraft der nicht erwärmten desinfizierten Gelatinekultur setzt eine einstündige Erwärmung auf 55° C die Wirksamkeit um ein Drittel herab, während eine weitere Erhitzung auf 60° C die Wirkung wieder erhöht. Eine weitere Erwärmung um 5° setzt diese wieder herab und endlich zerstört eine einstündige Erhitzung auf 70° das Enzym vollends. Die Nachprüfung an anderen Bakterienarten ergab für deren proteolytische Enzyme keine Analogie. Es hat den Anschein, als enthielte die Gelatinekultur der Käsespirillen noch eine zweite wärmeempfindliche Substanz, die durch eine Erwärmung auf 60° C zerstört wird, während sie vorher der Protease an der Entfaltung ihrer Wirkung hinderlich ist. Das proteolytische Enzym wird allerdings durch die Einwirkung von 55° C bereits geschädigt, wirkt aber selbst nach der Erhitzung auf 60° C durch die dabei erfolgte Ausschaltung der der Enzymtätigkeit hinderlichen Substanz immer noch so kräftig wie bei der Anwesenheit des hemmenden Stoffes unerwärmt. Dieser Befund drückt eben aus, daß der hemmende Einfluß in der unveränderten Enzymlösung genau gleich groß ist, als die Schädigung des Enzymes durch eine einstündige Erwärmung auf 60° C.

Weiter zeigen die zusammengestellten Versuche, daß *sämtliche untersuchten Bakterienproteasen durch eine einstündige Erwärmung auf 70° C sicher vernichtet werden*. Am *empfindlichsten* ist die Protease des *Staphylococcus pyogenes aureus*, die schon durch einstündige Erwärmung auf 55° C zerstört wird, und darin der aus Prodigiosus dargestellten gleicht, die ebenfalls in derselben Zeit bei 55° C vernichtet wird.

Eine Übersicht über den Verlauf der Hitzewirkung auf vier der oben angeführten Bakterienproteasen stellen die nebenstehenden Kurven dar. Dabei bezieht sich die *punktierte Linie* auf *Bacillus subtilis*, die *gestrichelte* auf den *Kieler Bazillus*, die *strichpunktierte* auf *Bacillus Milleri* und endlich die *vollausgezogene* auf *Käsespirillen*. Auf der *Ordinate* sind in gleichen Intervallen die in Millimetern gemessenen Höhen der Verflüssigungen aufgetragen und auf der *Abszisse* die Temperaturgrade verzeichnet, bei welcher die Gelatinekulturen durch eine Stunde vor der Verflüssigungsprobe gehalten wurden. Es fällt sofort der annähernd parallele Abfall der Linien auf, was ausdrückt, daß durch erhöhte Tem-

peraturen über das Optimum bei den untersuchten Enzymen die Wirkung annähernd gleich geschwächt wird.

Aus diesen Versuchen ist allerdings eine wesentliche Verschiedenheit der Widerstandsfähigkeit der untersuchten Enzymlösungen zu entnehmen, die aber mit zunehmender Reinheit der angewendeten Enzyme abnimmt. Eine Reindarstellung der Bakterienproteasen gelang bisher nicht. Doch erhält man jedenfalls reinere Produkte, wenn man die Bakterien auf eiweißfreien oder wenigstens eiweißarmen Nährsubstraten züchtet und in den davon erhaltenen Kulturfiltraten die Proteasen durch Alkohol, Alkoholäther oder Azeton in der üblichen Weise fällt. Wie aus den Untersuchungen von Fermi hervorgeht, bilden aber auf eiweißfreien Nährsalzlösungen nur die wenigsten Bakterien ein proteolytisches Enzym, wie Bacillus prodigiosus, Bacillus subtilis und Bacillus pyocyaneus (vgl. S. 37). Die Untersuchung der Widerstandsfähigkeit der auf eiweißfreiem Nährsubstrat gebildeten Protease von Bacillus prodigiosus und Bacillus pyocyaneus ergibt in der Tat eine sehr niedrige Zerstörungstemperatur in wässriger Lösung, die zwischen 53 und 56° C liegt. Dieser zuletzt genannte Versuch legt die Annahme nahe, daß die Bakterienproteasen sehr empfindliche Enzyme sind, deren Zerstörungstemperatur zwischen 50 und 60° C liegt. Größere Differenzen in der Vernichtungstemperatur für Proteasen scheinen darin ihren Grund zu haben, daß die untersuchten proteolytischen Enzyme in zu unreinen Lösungen der Erwärmung ausgesetzt wurden. Die Enzyme teilen ja mit der lebenden Zelle die Eigenschaft, durch verschiedene Substanzen vernichtet zu werden. Größere Alkali- oder Säuremengen sind daher für die Höhe der Vernichtungstemperatur von Bedeutung. Andererseits hat man die Beobachtung gemacht, daß im allgemeinen bei der Anwesenheit spaltbarer Substanzen die Vernichtungstemperatur für die Enzyme höher liegt. Auch sind die Verhältnisse in den Kulturen der einzelnen Bakterienarten in Bezug auf die in denselben nachweisbaren Stoffwechselprodukte höchst verschieden. Diese Überlegungen fordern zu großer Vorsicht in der Statuierung einer tiefer greifenden Verschiedenheit der Proteasen verschiedener Bakterienarten auf. Es ist nicht möglich, mit Sicherheit diese Frage eher zu entscheiden, als bis es gelingt, von den einzelnen Bakterienarten reine proteolytische Enzyme zu erhalten und diese dann auf ihre Hitzeresistenz zu prüfen.

Die durch Fällungen erhaltenen trockenen Enzympulver ertragen ohne Schädigung sehr hohe Hitzegrade. So kann man das proteolytische Enzym des Vibrio Finkler-Prior durch **zehn** Minuten auf **140° C** erhitzen, ohne dessen Wirksamkeit, sowohl auf Fibrin als auch auf Gelatine nennenswert herabzusetzen.

VI.

Fortsetzung der proteolytischen Bakterienenzyme.

Bakterienproteasen. Papayotin. Casease.

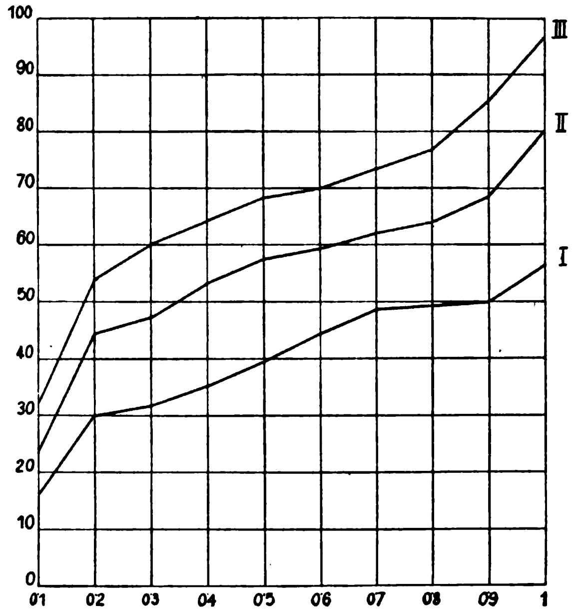
Die proteolytischen Enzyme äußern ihre Wirkung schon in kleinster Menge auf verhältnismäßig sehr große Dosen der spaltbaren Substanz. Immerhin besteht aber ein gewisses Verhältnis zwischen angewandter Enzymmenge und Quantität der zerlegten Stoffe. Die Trypsinwirkung folgt nach Pawlow der von Schütz aufgestellten und von Borissow bestätigten Regel, nach der die verdauende Kraft des Trypsins proportional ist den Quadratwurzeln aus den Fermentmengen. Abgeleitet wurde dieses Gesetz aus Bestimmungen der Zunahme der nicht koagulablen Stickstoffmengen bei der Pepsinverdauung. Es gilt aber nur für die Einwirkung auf gelöste Eiweißkörper, während bei der Verwendung von koagulierten Eiweißkörpern und von Gelatine vielmehr eine direkte Proportionalität zwischen der Fermentmenge und der gelösten Substanz zu bestehen scheint. Diese Gesetzmäßigkeit der Proteasenwirkung tritt jedoch nur deutlich auf, wenn verdünnte Enzymlösungen zur Anwendung kommen.

In der folgenden Zusammenstellung sind die Resultate wiedergegeben, die man mit einem Gelatinekulturfiltrat von Bacillus panis viscosi I Vogel nach 10tägigem Wachstum desselben erhält. Das Filtrat war unter Toluolzusatz gehalten und bewahrte seine proteolytische Wirksamkeit durch

Thymol-gelatine: ccm	Gelatine-kultur-Filtrat: ccm	Dest. Wasser ccm	Verflüssigung in mm bei 22 ° C nach		
			4 Tagen	8 Tagen	14 Tagen
1	0.1	0.9	1.6	2.3	3.2
1	0 2	0.8	3.0	4.4	5.4
1	0.3	0.7	3.2	4.7	6.0
1	0 4	0 6	3.5	5.3	6.4
1	0.5	0.5	3.9	5 7	6 8
1	0.6	0.4	4.4	5.9	7.0
1	0.7	0.3	4.8	6.2	7.3
1	0.8	0.2	4.9	6.4	7.6
1	0.9	0.1	5.0	6 8	8 5
1	1.0	0.0	5.6	8.0	9.6

zwei Monate unverändert. Die mit 7 proz. Thymolgelatine in einer Menge von 1 cm^3 beschickten, vollständig gleichweiten Röhrchen wurden mit dem in bestimmten Mengen derart verdünnten Kulturfiltrat versetzt, daß jedes folgende Röhrchen immer die doppelte Menge Enzym des vorhergehenden enthielt. Die Höhen der verflüssigten Gelatine wurden an der angebrachten Papierskala abgelesen und notiert. Die Versuchstemperatur hielt sich zwischen 21 und 22° C.

Aus der Tabelle ist zu entnehmen, daß sich bei dieser Anordnung nur bei den verdünntesten Enzymlösungen und bei verhältnismäßig kurzer Einwirkungsdauer die oben ausgesprochene Gesetzmäßigkeit erkennen läßt. Nach 4 Tagen ist die Verflüssigung mit 0.2 ccm Enzymfiltrat annähernd doppelt so groß als mit 0.1 cm^3 Kulturfiltrat. Selbst nach 8 tägiger Versuchsdauer ändert sich hier an dem Verhältnis noch nichts. Erst nach 14 tägiger Einwirkungsdauer ist eine Abnahme der Wirkung bei 0.2 cm^3 Enzym zu beobachten. Eine deutliche Hemmung macht sich geltend in Bezug auf die gelöste Menge und die Reaktionszeit bei gleicher Enzymmenge. Entsprechend der verdoppelten Reaktionszeit müßte sich für acht Tage eine Höhe der gelösten Gelatine von 3.2 mm für 0.1 cm^3 Enzym ergeben; in Wirklichkeit finden wir aber nur 2.3 mm. Dies hat vornehmlich darin seinen Grund, daß bei der Verwendung der Methode der gerade erstarrten Gelatineröhrchen eine Verteilung der gelösten Spaltungsprodukte nicht erfolgt und in dieser Zusammenstellung sehr wenig Enzymflüssigkeit in Verwendung stand, weshalb eine entsprechende Verdünnung der gelösten Gelatine nicht erfolgen konnte. Dieser Übelstand macht sich bei den konzentrierteren Enzymflüssigkeiten noch mehr geltend, wie die weiteren Versuche der Tabelle ergeben. Hier hört die angedeutete Gesetzmäßigkeit vollständig auf. Auffallend sind nur die Sprünge in der Verflüssigung bei Verwendung des unverdünnten Kulturfiltrates.



Trägt man auf die Ordinate die Höhen der verflüssigten Gelatine und auf die Abszisse die entsprechende Enzymmenge auf und verbindet die erhaltenen Marken, entsteht eine graphische Darstellung des Verlaufes des ganzen Versuches.

Aus den nebenstehenden Kurven ist ersichtlich, daß die relative Verflüssigungsstärke nach verschiedenen Zeiten ungefähr gleich bleibt, da die Kurven I, II und III annähernd parallel verlaufen. I zeigt den Verlauf der Verflüssigung nach 4, II nach 8 und III nach 14 Tagen. Außerdem ist zu ersehen, daß bei der gleichen Enzym-

menge in doppelter Zeit nicht die doppelte Menge Gelatine verflüssigt wird. Wohl aber wird in der gleichen Zeit bei doppelten Enzymmengen dann ungefähr die doppelte Menge gelöst, wenn die Lösungen sehr verdünnt sind. In unserem Falle finden wir diese Gesetzmäßigkeit nur bei einem Gehalte von 0.1 und 0.2 cm^3 Kulturfiltrat (enzymhaltige Substanz). Weitere Konzentrationen hemmen deutlich die Verflüssigung. Erst durch die Verwendung unverdünnten Kulturfiltrates wird ein Sprung in der Enzymwirkung hervorgebracht (zwischen 0.9 und 1). Eine Erklärung dafür kann zurzeit nicht gegeben werden.

Ein zweiter mit dem Kulturfiltrat von Bacterium panis[1]) angestellter Versuch zeigt in viel schönerer Weise die Abhängigkeit der Gelatineverflüssigung von der Enzymquantität und der Reaktionszeit. Hier waren viel bessere Bedingungen geschaffen. Einmal kamen größere Mengen enzymhaltiger Flüssigkeit zur Anwendung und dann wurde für eine Verteilung der gelösten Gelatine dadurch gesorgt, daß die auf Seite 25 angegebene Versuchsanordnung zur Anwendung gelangte. Das Kulturfiltrat stammte von einer Gelatinemassenkultur des Bacterium panis, die durch 14 Tage bei 35° gehalten wurde. Das Kulturfiltrat erwies sich als sehr reich an proteolytischen Enzymen, da es sehr kräftig Gelatine verflüssigte, gekochte Fibrinflocken, koaguliertes Hühnereiweiß und gekochten Kleber auflöste. Mit Toluolzusatz erhielt sich die proteolytische Kraft desselben durch 2 Monate. Zum Versuche diente ebenfalls 7 proz. Thymolgelatine in Röhrchen mit sehr kleinem inneren Durchmesser, der selbstverständlich bei allen Proben der gleiche war und 4 mm betrug. Diese Röhrchen tauchten in 5 cm^3 des gleichmäßig verdünnten Kulturfiltrates ein.

In der folgenden Tabelle sind die Versuche mit dem proteolytischen Enzym von Bacterium panis zusammengestellt.

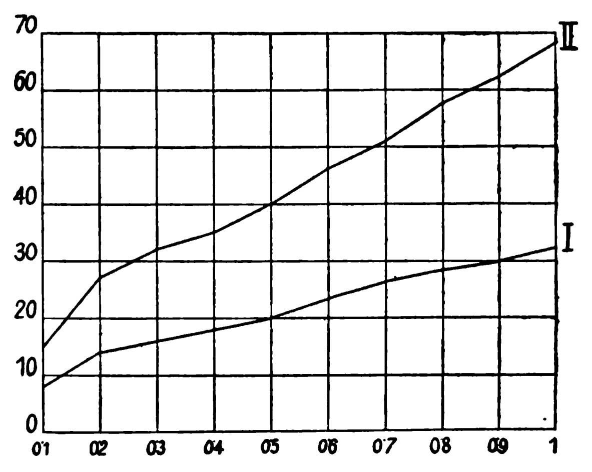
Menge des Kulturfiltrates in ccm	Destilliertes Wasser in ccm	Höhe der Verflüssigung bei 22° C nach	
		24 Stunden	48 Stunden
0.5	4.5	0.8	1.5
1.0	4.0	1.4	2.7
1.5	3,5	1.6	3.2
2.0	3.0	1.8	3 5
2.5	2.5	2.0	4.0
3.0	2.0	2 3	4.6
3.5	1.5	2.6	5.1
4.0	1.0	2.8	5.7
4.5	0.5	3.0	6.2
5 0	0.0	3.2	6.7

Aus dieser Tabelle ist die Gesetzmäßigkeit der Wirkung und der Reaktionszeit sehr schön zu sehen. In der doppelten Zeit wurde auch annähernd die doppelte Menge Gelatine in allen Proben gelöst. Die kleinen Abweichungen liegen sicherlich in der Ungenauigkeit der Methode. Diese Zusammenstellung zeigt wieder, daß eine direkte Proportionalität zwischen Enzymmenge und gelöster Gelatinemenge bei gleicher Zeitdauer der Wirkung nur in den Proben mit sehr verdünnten Enzymlösungen festzustellen

[1]) Ein aus fadenziehendem Brot reingezüchtetes Bakterium, das sehr kräftig Gelatine verflüssigt und Kleber zersetzt.

ist. Die Behinderung der Verflüssigung durch die bereits gelösten Produkte zeigt bei den mit konzentrierten Enzymlösungen versetzten Proben einen ungefähr gleichförmigen Charakter, was wohl in erster Linie auf eine durch die verwendete Versuchsmethode bedingte rasche und gleichmäßige Verteilung der gelösten Produkte bezogen werden muß.

Außerdem ist bei dieser Versuchsanordnung die absolute Menge der Enzymlösung sehr groß im Vergleich zur Menge der in Lösung gegangenen Gelatine, was für die Reinheit der Versuchsergebnisse gewiß von Bedeutung ist.



Die nebenstehenden Kurven geben die in der Tabelle zusammengestellten Versuchsergebnisse graphisch wieder. Kurve I bezieht sich auf eine 24stündige Reaktionszeit, Kurve II auf eine 48stündige Versuchsdauer. Sehr deutlich tritt die Gesetzmäßigkeit der Lösung bei zunehmendem Enzymgehalt bei 0.1 und 0.2 Enzymgehalt in Erscheinung, als Bestätigung des bereits anerkannten Gesetzes: Bei starken Verdünnungen ist die von verschiedenen Enzymmengen gelöste Gelatinemenge der wirkenden Enzymmenge direkt proportional. Außerdem zeigt die graphische Darstellung, daß von der gleichen Enzymmenge in der doppelten Zeit annähernd die doppelte Gelatinemenge gelöst wird.

Wir konnten schon feststellen, daß die proteolytischen Bakterienenzyme in Gegenwart von sehr geringen Säuremengen Fibrin nicht zu lösen vermögen, wohl aber Gelatine.

Claudio Fermi hat nun auch eine Reihe von proteolytischen Bakterienenzymen darauf untersucht, wie verschiedene Säuren auf den Gang der Gelatineverflüssigung einzuwirken vermögen. Dazu benutzte er folgende Säuren in 1 proz. Lösung: Chlorwasserstoffsäure, Salpetersäure, Schwefelsäure, Milch-, Apfel-, Ameisen-, Butter-, Zitronen-, Essig- und Karbolsäure. Auf 3 cm^3 Karbolgelatine wurden 1 cm^3 Enzymflüssigkeit und 2 cm^3 der 1 proz. Säuren geschichtet.

Die folgende Tabelle enthält die Resultate dieser Versuche von Fermi. Das +-Zeichen bedeutet eingetretene Verflüssigung, das —-Zeichen fehlende Verflüssigung.

Diese Zusammenstellung ergibt, daß Essigsäure wenigstens bei den Proteasen der untersuchten Mikroben in der angegebenen Konzentration die Gelatinolyse nicht aufhält, während Schwefelsäure sie vollständig unterdrückt. Relativ unschädlich für die Gelatineverflüssigung zeigten sich Zusätze von übrigen genannten Säuren mit Ausnahme der Salpetersäure. In Bezug

auf die Empfindlichkeit gegen Säurewirkung auf das Gelatineverflüssigungsvermögen steht obenan das proteolytische Enzym von Käsespirillenkulturen und Choleravibrionenkulturen. Dann

Proteolytisches Enzym von	Schwefelsäure	Salpetersäure	Salzsäure	Milchsäure	Apfelsäure	Buttersäure	Ameisensäure	Zitronensäure	Essigsäure	Karbolsäure
Bacillus prodigiosus . .	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Bacillus pyocyaneus . .	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Bacillus subtilis	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Bacillus Milleri	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Bacillus anthracis . . .	—	—	+	+	+	+	+		+	+
Bacillus tetani	—	—	—	—	—	+	—	+	+	—
Vibrio cholerae	—	—	+	—	—	—	—	—	+	—
Vibrio Finkler-Prior . .	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Käsespirillen	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—

folgt die Protease des Tetanusbazillus. Am wenigsten empfindlich erweisen sich die proteolytischen Enzyme der Bazillen und auffallenderweise des Vibrio Finkler-Prior.

Ob diese verschiedene Empfindlichkeit auf einen tieferen Unterschied in der Natur der untersuchten Proteasen liegt oder durch äußere Umstände in den enzymhaltigen Flüssigkeiten bedingt ist, entzieht sich zurzeit einer entscheidenden Beurteilung. Jedenfalls braucht man zur Erklärung dieser Erscheinungen nicht unbedingt an verschiedene Bakterienproteasen zu denken, denn mit einer Bindung der zugesetzten Säuren an verschiedene Substanzen, die sich in den verwendeten Kulturen finden, ist dabei jedenfalls zu rechnen. Je mehr Säure gebunden wird, umso weniger wird ihr hindernder Einfluß hervortreten. Auch ist zu berücksichtigen, daß in diesen Versuchen keineswegs äquimolekulare Säuremengen in Anwendung kamen, was ebenfalls nicht außer acht gelassen werden darf. Die Dissoziation in den einzelnen Proben ist ebenfalls mit in Erwägung zu ziehen. Jedenfalls können wir in den angegebenen Verschiedenheiten keinen zwingenden Grund zur Annahme von essentiell verschiedenen Proteasen erblicken.

Licht beeinflußt die Wirksamkeit der Bakterienproteasen wesentlich, wie die Versuche von Fermi und Pernossi dartun. Sie verteilten die verflüssigten Gelatinekulturen in Portionen von je 5 cm^3 in Röhrchen und setzten diese durch 200 Stunden dem direkten Sonnenlichte aus. Kontrollproben verblieben die gleiche Zeit im Dunkeln. Darnach prüften sie beide Versuchsreihen mit der üblichen Karbolgelatine auf die Verflüssigungsfähigkeit.

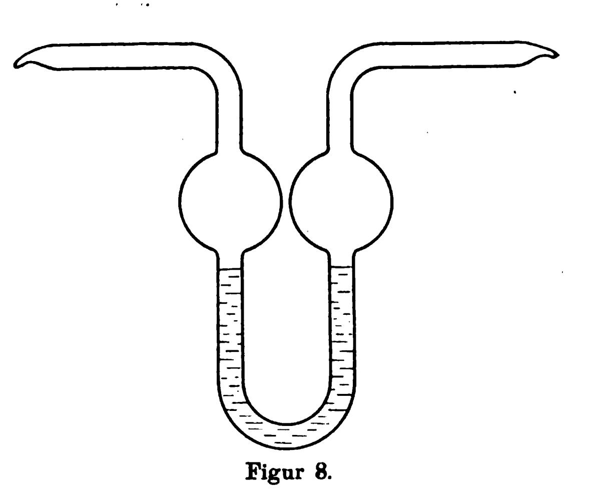
In der folgenden Übersicht (siehe Seite 51) sind die Versuchsergebnisse zusammengestellt.

Die Tabelle zeigt uns, daß durch die Einwirkung des direkten Sonnenlichtes in der angegebenen langen Versuchszeit in der Tat eine bedeutende Schädigung der Proteasen eingetreten ist. Dabei verhalten sich die Proteasen verschiedener Provenienz sehr verschieden. Sehr wenig beeinflußt sind die proteolytischen Enzyme des Bacillus indicus und der untersuchten Staphylokokken. Doch nach den gleichen Überlegungen wie früher können wir auch hierin keinen ge-

genügenden Beweis für die Verschiedenheit der untersuchten Proteasen erblicken.

Untersuchte Gelatinekultur von:	Verflüssigung in mm nach 200stündigem Aufenthalt im Sonnenlicht	ebensolangem Aufenthalt im Finstern
Vibrio Massauae	12	25
Vibrio cholerae, Stamm Hamburg	9	23
Vibrio Deneki	5	10
Vibrio Milleri	10	29
Bacillus anthracis	3	9
Bacillus radiciformis	2	10
Bacillus subtilis	0	4
Bacillus prodigiosus	4	28
Bacillus aus Kiel	4	16
Bacillus pyocyaneus	8	22
Bacillus indicus	24	25
Bacillus proteus vulgaris	2.5	7
Staphylococcus pyogenes albus	8	10
Staphylococcus pyogenes tenuis	16	18

Für die Schwächung der Proteasen durch das Sonnenlicht müssen wir in erster Linie den Sauerstoff der Luft verantwortlich machen, der auch unter Lichtabschluß eine Verminderung der gelatinolytischen Enzyme herbeiführt, die aber wesentlich geringer ist. Wenn man nämlich sorgfältig jeden Luftsauerstoff entfernt, so wirkt das direkte Sonnenlicht innerhalb von 100 Stunden gar nicht ein wie die folgenden Versuche dartun. Bei diesen Versuchen wurden die enzymhaltigen Kulturfiltrate in Glasröhren gebracht, die zwei Kugeln tragen, wie es in Figur 8 dargestellt ist. Der zwischen den Kugeln befindliche Raum wurde mit dem Filtrat gefüllt und dann durch eine Stunde in einem Falle Kohlensäure, im andern Falle Wasserstoff hindurchgeleitet, so daß die Enzymflüssigkeit damit vollständig gesättigt war. Ohne Unterbrechung des Gasstromes wurden dann die beiden Enden der Röhrchen abgeschmolzen und die Enzyme im betreffenden Gas dem Sonnenlicht vor weißem Karton ausgesetzt. Die Temperatur der Röhrchen stieg dabei nicht über 35° C. Zugleich wurde eine Probe in Luft daneben gehalten. Eine vollständig identische Versuchsreihe befand sich die Zeit über im Dunkeln. Mittels 7 proz. Thymolgelatine in gerade erstarrter Form wurde dann die Prüfung auf die Enzymwirkung angestellt. Dabei ergab sich, daß die verflüssigende



Figur 8.

Kraft nach 100stündiger Sonnenbestrahlung vom Kulturfiltrat des Bacillus panis viscosi I Vogel in der Kohlensäure- und Wasserstoffatmosphäre vollständig ungeschwächt erhalten blieb und mit den von den im Dunkeln in Wasserstoff und Kohlensäure verbliebenen Enzymlösungen verglichen, gleich groß war. Nur die in der Luft besonnte Enzymlösung verlor davon etwa ein Viertel und die im Dunkeln in Luft aufbewahrte etwa ein Neuntel. Damit ist dargetan, daß die in Luft auch im Dunkeln eintretende allmähliche Enzymzerstörung durch Besonnung nur beschleunigt wird, während die Sonnenbestrahlung in indifferenten Gasen keine schädigende Wirkung hervorbringt.

Demnach empfiehlt es sich auch, Enzymlösungen in Wasserstoff oder Kohlensäure aufzubewahren, um sie möglichst lange in gleicher Wirksamkeit zu erhalten und länger dauernde Enzymversuche ebenfalls in den genannten Gasen durchzuführen.

Bei Fermi und Pernossi finden wir die Angabe, daß Kohlensäure die proteolytischen Enzyme von Bacillus Milleri, Vibrio cholerae und Vibrio Deneki in der Wirkung behindert. Die genannten Autoren leiteten durch 15 Stunden Kohlensäure durch ein Gemisch von verflüssigter Gelatine, in der die bezeichneten Mikroben gewachsen waren, und von dem Desinfektionsmittel und fanden eine geringe Abschwächung der Wirkung. In diesem Versuche kann allerdings auch durch die Sättigung mit Kohlensäure eine Förderung der abschwächenden Wirkung des Desinfektionsmittels eingetreten sein. Diese Gasversuche sollen, wenn irgend möglich, unter Ausschluß anderer schädigender Agentien vorgenommen werden, um einwandsfreie Resultate zu ergeben. Deshalb wurden die oben berichteten Belichtungsversuche in einem bestimmten Gas ohne Desinfektionsmittel mit sterilem Kulturfiltrat in sterilen Kugelröhren ausgeführt.

Schwefelwasserstoff übt eine deletäre Wirkung auf alle Bakterienproteasen aus, die allerdings in ihrer Stärke einige Verschiedenheit bei den Enzymen verschiedener Herkunft aufweist.

Fermi und Pernossi untersuchten darauf die proteolytischen Enzyme zahlreicher Bakterienarten, indem sie die von ihnen verflüssigte Gelatine zu gleichen Teilen mit 2 proz. Karbollösung mischten und durch eine Stunde bezw. zwei Stunden einen Schwefelwasserstoffstrom hindurchschickten. Dann wurde mit gerade erstarrter Gelatine nach fünf- bezw. zehntägiger Einwirkungsdauer die Verflüssigung gemessen. Eine Entfernung des in Lösung gegangenen Schwefelwasserstoffes scheint nicht vorgenommen worden zu sein.

Die proteolytischen Bakterienenzyme gehen durch Pergament bei der Dialyse nicht hindurch, selbst wenn man die Dialyse über mehrere Tage ausdehnt.

Wie schon einigemale bemerkt, gelang es bisher nicht, eine Bakterienprotease rein darzustellen. Demnach kann man über die chemische Natur derselben keine genaueren Angaben machen. Jedenfalls scheint es sich wie beim Trypsin um Körper zu handeln, die den Eiweißkörpern nahestehen. Claudio Fermi[1]) will zwar proteolytische Enzyme von Mikroorganismen nachgewiesen haben, die absolut keine Spur

---

[1]) Cl. Fermi, Zentralbl. f. Bakt., II. Abt., Bd. 2, 1896.

von Stickstoff in jedweder Form enthalten haben sollen. Diese stammen angeblich von Bakterien (und Hyphomyzeten und Blastomyzeten) die in vollständig stickstofffreier Nährlösung gezüchtet wurden und auch selbst als stickstofffrei sich erwiesen. Diese Angaben sind mit unseren bisherigen Anschauungen vom Protoplasma, das doch jedenfalls als Eiweißsubstanz aufzufassen ist, unvereinbar und bedürfen jedenfalls einer sehr genauen und eingehenden Untersuchung.

Von Dungern konnte an normalem Blutserum hemmende Wirkungen auf peptonisierende Bakterienfermente beobachten. Eine viel stärkere Antiwirkung wurde durch künstliche Immunisierung erhalten. So zeigte das Blutserum eines Menschen, der an einer Staphylokokkenosteomyelitis litt, die 20 fach hemmende Wirkung als das Serum eines Mannes, der an keiner Staphylokokkeninfektion erkrankt war. Diese Antiprotease wirkt bis zu einem gewissen Grade spezifisch, da die Protease des Choleravibrio weniger und das proteolytische Enzym des Vibrio Finkler-Prior noch bedeutend geringer gehemmt wurde. Nach Moreschi besitzt das normale Kaninchen- und Menschenblutserum hemmende Eigenschaften. Nach Injektionen von Kaninchen mit Cholerabouillonkulturen erhielt der genannte Autor sehr hochwertige Sera. Hata spricht dem normalen Pferdeserum besonders große antienzymatische Eigenschaften zu.

Papayotin.

Den eben beschriebenen proteolytischen Bakterienenzymen steht ein bei Bakterien zwar sehr wenig verbreitetes, aber doch höchstwahrscheinlich vorkommendes Enzym nahe, das Papayotin. In dem Bacillus fluorescens liquefaciens fanden Emmerling und Reiser[1]) ein eiweißspaltendes Enzym, dessen Tätigkeit bei der Eiweißfäulnis bereits eingehend besprochen wurde und das dem Papayotin sehr nahe steht, vielleicht mit ihm identisch ist. Das Papayotin, das von Moncorvo zuerst aus dem Safte des Melonenbaumes (Carica papaya) dargestellt und später von Beckolt Papayotin genannt wurde, wirkt nach verschiedenen Angaben sowohl bei leicht alkalischer als auch ganz schwach saurer Reaktion auf Fibrin lösend, wobei aber eine mehr unvollkommene Spaltung unter Bildung großer restierender Peptonmengen eintritt. Darin scheint ein Unterschied zwischen den Bakterienproteasen und dem Papayotin zu liegen, nachdem wir von ersteren feststellen konnten, daß sie selbst in schwachsaurer Lösung in der Fibrinspaltung behindert werden. Außerdem wirken die bakteriellen proteolytischen Enzyme bei 37° bedeutend rascher und energischer als Papayotin, das bei dieser Temperatur nur sehr langsam und sehr geringe Mengen von Fibrin aufspaltet. Dabei stellen sich die einfacheren Verdauungsprodukte, wie Aminosäuren, nur in spärlicher Menge und sehr spät ein. Aus Untersuchungen von Delezenne, Mouton und Pozerski ergibt sich nun die höchst interessante Tatsache, daß in Proben des Ovalbumins und Serumalbumins mit Papayotin und Spuren von Essigsäure unmittelbare Erhitzung auf 100° nach dem Zusammengeben eine sehr energische Verdauung herbeiführt, die aus dem nachherigen Mangel der Koagulationsfähigkeit des größten Teiles von

---

[1]) Emmerling und Reiser, Berichte der deutsch. chemisch. Gesellsch., Bd. 35, 1902, S. 700.

Ovalbumin bezw. Serumalbumin hervorgeht. Durch besondere Fällungen können natürlich auch die Spaltungsprodukte von den ungespaltenen Anteilen getrennt werden. Jonescu[1]) verfolgte diese Untersuchungen weiter an Hühnereiweiß und Blutserum und gelangte dabei zu ähnlichen Resultaten. Eine Sekunde nach der Mischung von Papayotin und Hühnereiweiß ausgeführte Erhitzung ergab an verdautem Eiweiß 0.6019, fünf Sekunden nach dem Mischen vollführte Erwärmung ergab 0.53331 Verdauungsprodukt und endlich fünfstündiges Stehenlassen bei Zimmertemperatur vor dem Erhitzen auf 100° ergab nur 0.1098 verdautes Eiweiß. Demnach wird in der hohen Temperatur eine äußerst rasch verlaufende Verdauung, die allerdings nur zur Bildung von Peptonen führt, vollzogen. Die mit Hammelblutserum ausgeführten Proben führten zu den gleichen Ergebnissen. In der Tat haben Versuche zur Bestimmung des Temperaturoptimums für die Papayotinwirkung Temperaturen zwischen 80—90° ergeben, während eine erheblichere Verdauung auch schon bei 70—80° einsetzt. Zwischen 90 und 100° hört die Wirkung auf. Die plausibelste Erklärung für diese eigenartige Erscheinung gibt Jonescu, indem er meint, daß das Papayotin bei niederer Temperatur eine feste Bindung mit dem Eiweiß eingeht und dadurch umso unwirksamer wird.

Wir hätten im Papayotin also ein Enzym vor uns, das ein sehr hohes, über der Koagulationstemperatur liegendes Temperaturoptimum besitzt. Es wäre sehr wichtig, die Versuche von Delezenne und Jonescu mit dem papayotinähnlichen Ferment von Bacillus fluorescens liquefaciens anzustellen und ähnliches besonders mit thermophilen Bakterien und ihren proteolytischen Enzymen vorzunehmen. Den eben genannten Untersuchungen entsprechend muß doch ein tieferer Unterschied zwischen Trypsin und Papayotin bestehen, der zur Auseinanderhaltung beider herausfordert.

Elastinlösendes Enzym.

Eine besondere Besprechung bedarf das Elastinlösende Enzym einiger Bakterienarten, das Eijkman[2]) auffand und einer Untersuchung unterzog. Für den Nachweis verwendete Eijkman die Diffusionsmethode in Agar. Das Elastin stellte der genannte Autor aus feingeschnittener Kalbslunge durch tagelanges Behandeln mit verdünnter Kalilauge und Essigsäure bei 37° her. Nach dem Auswaschen des restierenden Elastins mit Wasser wurde es getrocknet und fein pulverisiert. Vor dem Gebrauch wurde das Pulver in Wasser aufgeschwemmt, einer fraktionierten Sterilisation bei 90° unterzogen und nach dem Absitzen der gröberen Teilchen die darüberstehende gleichmäßig trübe Flüssigkeit mit verflüssigtem Nähragar vermischt zu Platten verarbeitet. Auch fein zerriebenes Ligamentum nuchae und das Elastin der Arterienwand fand mit dem gleichen Ergebnis Verwendung, nur ist auf eine möglichst niedrige (80°) Sterilisierungstemperatur zu achten, um Zusammenballungen zu vermeiden. Wenn nun auf „Elastin-Agar" Mikroben in Reinkultur verimpft wurden, zeigten einige derselben um die Kolonien eine deutliche mehr oder minder

[1]) Jonescu, D., Biochemische Zeitschr., Bd. 2, 1906, S. 177. Dort auch die einschlägige Literatur genau angegeben.

[2]) Eijkman, Zentralbl. f. Bakt., I. Abt., Orig., Bd. 35, 1904.

weit ausgebreitete Aufhellung, die durch ein diffusibles Enzym erzeugt wurde. Die mikroskopische Untersuchung ließ unzweideutig erkennen, daß es sich um eine Auflösung des Elastins handelte. Diese Eigenschaft zeigten sehr gut der Bacillus pyocyaneus, etwas weniger gut Bacillus anthracoides, minder gut Bacillus fluorescens liquefaciens und Bacillus anthracis. Auch ein aus Abwasser und zwei aus einem Fall von Lungengangrän gezüchtete Bakterienarten erwiesen sich als stark elastinlösend. Daß es sich dabei um eine Enzymwirkung handelt, geht daraus hervor, daß das bakterienfreie Filtrat der Kulturen von den genannten Bakterienarten die gleiche elastinlösende Fähigkeit besaß, wie die lebenden Mikroben und daß eine Erhitzung auf 80° C die Wirkung dieses Enzymes aufhob. Alle untersuchten Bakterienarten, die ein elastinlösendes Enzym bilden, vermögen zwar die Gelatine zu peptonisieren, doch umgekehrt sind keineswegs alle gelatineverflüssigenden Mikroben imstande, Elastin zu lösen. Ob es sich um ein spezifisch anderes Enzym handelt, als um die weitverbreitete Bakterienprotease oder um eine besondere Modifikation derselben, kann nach den wenigen Versuchen darüber kaum entschieden werden.

Casease.

Anhangsweise bedarf die Casease Ducleaux's[1]) noch kurzer Erwähnung. Nach dem genannten Autor ist speziell für die Peptonisierung des Caseins ein besonderes Enzym anzunehmen, das er als Casease bezeichnete. Sie steht so wie die übrigen proteolytischen Enzyme dem Trypsin sehr nahe und scheint keine Ausnahmestellung zu verdienen. Mit Eijkman können wir sie ohne weiteres mit den Proteasen identifizieren.

---

[1]) Ducleaux, Le lait. Paris 1887.

VII.

Fortsetzung der proteolytischen Bakterienenzyme.

Lysine.

Bakterienhämolysine.

Es wurde eine Anzahl von Mikroorganismen bekannt, die die Fähigkeit besitzen, lebende Zellen zu lösen, wie man sich kurz ausdrückt. Dieser Vorgang kann entweder in einer totalen Lösung der Zellen bestehen oder es wird dabei das Protoplasma derart beeinflußt, daß lebenswichtige Stoffe abgegeben werden. Dieser Eingriff bewirkt natürlich in der Folge den Tod der betroffenen Zelle, die weiterhin einer Lysis anheimfällt, die aber besser als sekundärer Vorgang aufgefaßt wird, der mit der ersten Phase der Zelllösung, dem Austritte bestimmter Inhaltskörper, nicht in Verbindung gebracht wird. Daß es sich bei diesen lytischen Vorgängen nicht um eine unmittelbare Tätigkeit der lebenden Mikroorganismen handeln kann, geht daraus hervor, daß auch die keimfreien Kulturfiltrate und die getöteten Bakterienkulturen diese Eigenschaft beibehalten. Man brachte die lytischen Substanzen mit Toxinen zusammen, was natürlich nahe lag, da man dieselben gerade bei giftproduzierenden Bakterienarten zuerst fand und vom Gifte verhältnismäßig schwer zu trennen vermochte.

Ehrlich hatte im Jahre 1898 zuerst die bedeutende Tatsache bekannt gemacht, daß in den Kulturen des Tetanusbazillus ein hämolytisches Toxin enthalten ist, eine Substanz, die intakte rote Blutkörperchen zur Abgabe des Hämoglobins veranlaßt und auf diese Weise sie rasch zerstört. Schon dabei zeigte sich die Erscheinung, daß die Ammonsulfatfällungen verschiedener Tetanus-Bouillonkulturen in ihrer blutlösenden Fähigkeit sehr verschieden waren, ebenso in ihrer spezifisch giftigen Wirkungsweise auf die Nervenzelle. Es ist ja auch die hämolytische Substanz der Tetanuskulturen keineswegs mit dem Toxin derselben Herkunft identisch, das die typischen Tetanuskrämpfe hervorbringt und als Tetanospasmin bezeichnet wird. Die Verschiedenheit leitet sich aus den Ehrlich'schen Beobachtungen ohne weiteres ab. Der genannte Forscher konnte nachweisen, daß wie schon angedeutet, durchaus kein Verhältnis zwischen nachweisbarem Tetanospasmin und Tetanolysin (wie man die blutlösende Substanz nennt) besteht. Die beiden Substanzen verhalten sich gegen thermische Einflüsse verschieden, indem das Tetanolysin

schon nach kurzer Erwärmung auf 56° C unwirksam wird, während das Tetanospasmin hitzebeständiger ist. Außerdem gelingt eine Trennung beider Stoffe in der Weise, daß durch Erythrozyten das Tetanolysin gebunden wird, während das Tetanospasmin unverändert in der Flüssigkeit zurückbleibt. Einen wichtigen Beweis für die Verschiedenheit beider Substanzen müssen wir auch in der spezifischen Wirkung der künstlichen Immunsera erblicken, die mitunter das Tetanospasmin prompt neutralisieren, ohne auf das Lysin eine nennenswerte Antiwirkung zu entfalten.

Auch eine Reihe von pathogenen Staphylokokken erzeugt in den Kulturen Erythrozyten und Leukozyten lösende Stoffe, die sich vom Tetanolysin in ihrem Verhalten gegen Immunsera merkbar unterscheiden und als Staphylolysin und Leucocidin bezeichnet werden.

Die Kulturen des Bacillus pyocyaneus enthalten ebenfalls neben den bereits besprochenen Proteasen und neben den Farbstoffen noch äußerst interessante Stoffe, die ebenfalls den Lysinen zuzuzählen sind.

Lysine wurden unter anderem auch in den Kulturen des Diphtheriebazillus, des Bazillus der Hühnercholera, von Streptokokken, von Typhus- und Colibazillen, von Pneumoniekokken, von Anthrabazillen und endlich von Choleravibrionen und ihnen nahestehenden Vibrionen nachgewiesen.

Für die Bildung der bakteriellen Hämolysine scheint nach den Untersuchungen von Glässner und Roscules die Anwesenheit von freiem Sauerstoff keine Rolle zu spielen. Von Bedeutung aber ist die Menge der verfügbaren Eiweißstoffe in der Kulturflüssigkeit, da im allgemeinen die Hämolysinproduktion in Gegenwart größerer Eiweißmengen gesteigert ist.

Die Wirkungsweise dieser bakteriellen Hämolysine klingt in sehr vielen Beziehungen an diejenige der Enzyme an und es ist besonders nach den Untersuchungen von Schur gerechtfertigt, sie den proteolytischen Enzymen anzuschließen. Aus den Untersuchungen des genannten Autors geht mit Sicherheit hervor, daß wenigstens beim Staphylolysin dieselben Gesetze in Bezug auf die absolute Menge gelösten Hämoglobins bei vermehrter Blutmenge und gleicher Lysinmenge und deren relative Abnahme herrschen, wie bei einer Reihe anderer Enzyme und diesen zugehörigen Zersetzungsprodukten. Außerdem besteht eine Spontanhämolyse, die an und für sich schon mit einer ziemlichen Geschwindigkeit verläuft und die eben durch das Hämolysin[1]) eine enorme Beschleunigung erfährt. Nach der allgemeinen Definition der Enzyme müssen wir aber alle Substanzen ihnen zurechnen, die eine Beschleunigung von spontan verlaufenden Vorgängen herbeiführen, ohne mit dem Umsetzungsprodukt selbst eine Verbindung einzugehen. Die Hämolyse können wir ungezwungen als eine Zerlegung der roten Blutzellen in Hämoglobin und restierende Zellbestandteile auffassen. Das Lysin ist in diesem Falle der Pseudokatalysator, der den Zersetzungsvorgang beschleunigt, und muß folgerichtig den Enzymen zugerechnet werden.

---

[1]) Eine eingehende Literaturzusammenstellung über die künstlichen Hämolysine und über die Hämolysine im allgemeinen findet sich bei: Sachs, Die Hämolyse und ihre Bedeutung für die Immunitätslehre. Über bakterielle Hämolysine und Antihämolysine besonders bei Kraus, R. und Clairmont, Wiener klin. Wochenschr. 1901.

Die hämolytischen Versuche stellt man in der Regel in der Weise an, daß man entweder defibriniertes Blut mit der Lysinlösung in Berührung bringt oder aber gewaschene und in isotonischer Kochsalzlösung aufgeschwemmte Erythrozyten der verschiedenen Tiere verwendet. Als Waschflüssigkeit und Aufschwemmungsflüssigkeit empfiehlt sich im allgemeinen eine 0.70—0.85 proz. Kochsalzlösung in destilliertem Wasser. Die Resistenz der Blutkörperchen der verschiedenen Tiere und des Blutes derselben Tierspezies ist nicht unerheblich verschieden, so daß bei allen diesen Versuchen immer mit Kontrollproben gearbeitet werden muß. Die Waschung der Erythrozyten soll bei möglichst niedriger Temperatur und möglichst rasch durchgeführt werden. Dazu eignen sich besonders raschlaufende Zentrifugen. Die Beurteilung des Verlaufes der Hämolyse geschieht im allgemeinen nach der Menge des gelösten Hämoglobins. Diese aber exakt zu bestimmen ist nicht leicht. Außerdem ist daraus der Rückschluß auf die Stärke des Hämolysins nur mit Vorsicht zu ziehen, da ein verhältnismäßig schwaches Hämolysin oder geringe Hämolysinmengen dennoch eine starke Hämoglobinlösung hervorbringen können, wenn die Resistenz der verwendeten Erythrozyten eine geringe ist. Aus diesem Grunde lassen sich die gefundenen Zahlen oder Angaben nicht ohne weiteres untereinander vergleichen, selbst dann nicht, wenn die roten Blutkörperchen einer einzigen Tierspezies oder desselben Tieres, zu verschiedenen Zeiten entnommen, Verwendung finden. Der Gebrauch gewaschener Erythrozyten hat zumindest den Vorteil, wenigstens das an verschiedenen hemmenden Stoffen reiche Blutserum auszuschalten, zumal die die Hämolyse hindernden Substanzen (Antihämolysine) auch normalerweise in wechselnden Mengen sich im Blute finden. Es besteht allerdings der Nachteil dabei, daß im allgemeinen die gewaschenen, also vom Serum befreiten, und in 85 proz. Kochsalzlösung aufgeschwemmten Erythrozyten rascher der spontanen Lysis anheimfallen, als die im Serum bewahrten. Bei den meisten Lysinversuchen versetzt man unter sofortigem Umschütteln die Blutaufschwemmung mit der Lysinlösung und setzt die Probe 1—2 Stunden der Temperatur von 37 ° C aus. Darnach verbleiben dieselben noch 12 — 24 Stunden bei Zimmertemperatur. Gewöhnlich bestimmt man erst nach diesen Einwirkungszeiten aus der Menge der ungelösten Blutkörperchen und des frei gewordenen Hämoglobins die Stärke der Hämolyse.

Für den Nachweis von Hämolysinen beim Wachstum der verschiedenen Bakterienarten eignet sich auch sehr gut die schon von Eijkman und anderen vielfach benutzte Blutagarplatte. Aus der mehr oder minder weiten Ausbreitung der Zone der gelösten Blutkörperchen kann wenigstens annähernd auch auf den Grad der Hämolyse geschlossen werden.

Wenn wir die von den verschiedenen Bakterienkulturen stammenden Hämolysine kurz charakterisieren wollen, können wir folgendes aussagen.

Das von Ehrlich entdeckte und von Thorwald Madsen genauer untersuchte Tetanolysin wird von roten Blutkörperchen, die entweder gewaschen und in 0.85 proz. Kochsalzlösung aufgeschwemmt sind oder sich im defibrinierten Blut befinden, gebunden[1]) und äußert seine

---

[1]) Vgl. bezüglich der Bindungsverhältnisse im allgemeinen Volk, Zentralbl. f. Bakt., I. Abt., Orig., Bd. 34, 1903.

Wirkung nach einer bestimmten Latenzzeit. Die einzelnen Blutsorten werden aber verschieden stark gelöst und bei den Blutkörperchen desselben Tieres ist die Widerstandskraft verschieden. Letztere wird höchstwahrscheinlich durch das verschiedene Alter der im Kreislauf befindlichen Erythrozyten bedingt. Maßgebend für die Größe der Hämolyse in einer bestimmten Zeit ist neben der Temperatur auch das Verhältnis zwischen der Anzahl der Blutkörperchen und der Menge des Tetanolysins. Eine Erniedrigung der Temperatur bedingt aber auch eine Verlängerung der Latenzzeit. Wird eine 5 proz. Pferde- oder Kaninchenblutaufschwemmung mit einer hinreichenden Menge von Tetanolysin versetzt und nach Durchschütteln der Probe bei 37° C gehalten, findet eine äußerst rasche und komplette Hämolyse statt. Die optimale Wirksamkeit liegt also um 37° C. Höhere Temperaturen schwächen das Tetanolysin und 50° C macht es innerhalb einer Stunde unwirksam. Das Tetanolysin ist überhaupt eine äußerst labile Substanz, die in verdünnten Lösungen und im Lichte schon bei gewöhnlicher Temperatur rasch abgeschwächt wird. Dabei findet eine Umwandlung des Lysins statt. Das Tetanolysin geht in eine Modifikation über, die allerdings noch Bindungsfähigkeiten besitzt, jedoch keine oder nur geringe Lysinwirkung aufweist. Durch Einspritzen von Tetanolysin in den Tierkörper gelingt die Gewinnung eines spezifischen Antitetanolysinserums, das dann die Fähigkeit besitzt, die Tetanolysinwirkung von vornherein auszuschalten und später zugesetzt, jederzeit die Hämolyse zu unterbrechen und aufzuhalten.

Das Staphylolysin, genauer untersucht von Neisser und Wechsberg, löst ebenfalls rote Blutkörperchen verschiedener Tierspezies. Am empfindlichsten erwiesen sich die gewaschenen (oder ungewaschenen) Erythrozyten des Kaninchens, dann folgen mit abnehmender Empfindlichkeit die roten Blutkörperchen des Hammels, des Schweines, des Hundes, der Ziege, des Pferdes, der Gans und des Menschen. Die Verschiedenheit der Empfindlichkeit ungewaschener Erythrozyten findet ihre Aufklärung darin, daß im Serum der einzelnen Tierspezies von Haus aus die Lysinwirkung hemmende Substanzen, also normale Antilysine vorhanden sind. Sehr arm daran ist das Kaninchenblut, weshalb dessen Erythrozyten sowohl im gewaschenen als auch im ungewaschenen Zustande annähernd gleich empfindlich sind. Das Staphylolysin läßt sich durch Filtration mit Chamberland'schen Kerzen aus den Kulturen gewinnen, wird also von den Kokken in das Nährsubstrat abgegeben.

Die pathogenen Staphylokokken, sowohl die Art aureus als auch die Art albus, produzieren das Lysin, während es bei den nicht pathogenen Arten fehlen soll. Über die Verwendbarkeit dieses Merkmales zur Unterscheidung pathogener Staphylokokken von den nicht pathogenen gehen die Ansichten der Untersucher auseinander. Van Durme erhielt keine eindeutigen Resultate. Ebenso fanden Fraenkel und Baumann einen Hämolysin bildenden, aber nicht pathogenen Staphylokokkenstamm. Lohr isolierte einen Sepsis erregenden Staphylokokkus, der kein Hämolysin erzeugte. Nach Kutscher und Konrich bilden alle durch hochwertige mit pathogenen Staphylokokken erzeugten Immunsera agglutinablen Staphylokokken das Hämolysin.

Zur lebhaftesten Bildung des Hämolysins werden diese Bakterien durch einen sehr geringen Alkalizusatz (Natron-Kalilauge) zur Nähr-

bouillon angeregt. Dieser darf nur sehr gering sein und ist dann optimal, wenn er höchstens $^1/_3$—$^1/_2$ derjenigen Menge von $^1/_{10}$ N. Natron-Kalilauge beträgt, die der mit Phenolphtalein versetzten Nährbouillon eine eben deutliche Rotfärbung erteilt. In derartigen Kulturen bemerkt man das erste Auftreten von Hämolysin am 4. oder 5. Tage. Von da ab nimmt seine Menge bis zum 14. Tage zu und fällt dann wieder ab. Wie das Tetanolysin ist auch das Staphylolysin sehr empfindlich und schwächt sich schon bei Zimmertemperatur innerhalb von einigen Wochen beträchtlich ab. Im Eisschrank dagegen ist es mit Karbolsäurezusatz mitunter monatelang unverändert haltbar. Gegen stärker erhöhte Temperaturen ist es sehr wenig widerstandsfähig und wird schon durch einen 20 Minuten dauernden Aufenthalt in 48° C sichtlich geschädigt und nach dieser Zeit bei 56° vollständig vernichtet. Das Staphylolysin wirkt am energischesten und raschesten bei einer Temperatur von 35—37° C. Bei 0° findet meistens nur eine Bindung des Lysins an die Erythrozyten statt, die ziemlich fest ist und mehrmaliges Waschen mit physiologischer Kochsalzlösung erträgt. Für gewöhnlich findet dann die Lösung der Blutkörperchen in der wenig über Null erhöhten Temperatur langsam, bei 37° C aber sehr rasch statt. Es wird zwar manche Blutsorte schon bei 0° lackfarben gemacht, was aber Neisser und Wechsberg auf eine besonders geringe Resistenz der darin befindlichen Erythrozyten zurückführen. Durch Einspritzen von Staphylolysin in Kaninchen oder Ziegen gelingt es, ein spezifisches Antistaphylolysin zu gewinnen, denn das Blutserum der behandelten Tiere hat in kurzer Zeit die Fähigkeit, das Staphylolysin in seiner Wirkung zu hemmen. Bemerkenswert ist der Umstand, daß dieses Immunserum auf jedes Staphylolysin wirkt, einerlei, ob es von Staphylococcus pyogenes aureus oder St. p. albus stammt.

Das Hämolysin der Diphtheriebazillen verhält sich insofern different, als es allem Anscheine nach nicht in das Kulturmedium abgegeben wird, denn die Tonzellenfiltrate von Bouillonkulturen des Loeffler'schen Bazillus erwiesen sich als hämolytisch unwirksam. Für dieses Lysin ist es nicht gelungen, ein spezifisches Antilysin künstlich durch Injektion zu erhalten, wie aus den Untersuchungen von Schwoner zu entnehmen ist.

Bezüglich der Ausscheidung eines Hämolysins sind aber die Akten noch keineswegs geschlossen, zumal in den ersten Kulturperioden der hämolytisch wirksamen Bakterienarten in den Kulturfiltraten kein Lysin nachweisbar ist. Dieses findet man meistens erst vom zweiten oder dritten Kulturtage an, also zu einer Zeit, wo schon eine große Anzahl von Bakterien bereits tot ist. In der Folge nimmt die Lysinmenge zu und erreicht zwischen dem 10. und 15. Kulturtage ihren Höhepunkt. In diesen Zeiten findet aber bereits eine sehr träge Vermehrung statt, dafür aber ein ausgiebiges Absterben von Zellen. Nach dem 15. Kulturtage ist bei üppigem Gedeihen einer Bakterienart der Nährboden sehr erschöpft und die Vermehrung dementsprechend auf ein Minimum gesunken; vielmehr produzieren die Mikroorganismen Formen, die für die Erhaltung der Art insofern von Bedeutung sind, als sie sich durch besondere Resistenz auszeichnen. Dies trifft nicht nur bei den sporenbildenden Arten zu, sondern noch mehr bei den sporenlosen Bakterienspezies, die als Endform ihres Entwicklungskreises ebenfalls Bildungen aufweisen, die sich durch größere Widerstandskraft gegen die verschiedenen, normalerweise auftretenden

Schädigungen auszeichnen. Gerade diese Formen scheinen aber ihren Stoffwechsel auf ein Minimum herabgesetzt zu haben und enthalten auch keine nachweisbaren, größeren Enzymmengen, soweit es sich wenigstens um proteolytische Enzyme handelt. Es erscheint die Annahme mit großer Wahrscheinlichkeit gerechtfertigt, daß nur die mit einem regen Stoffwechsel ausgestatteten Formen des Entwicklungskreises einer Bakterienart besonders Enzyme bilden. Es sind die vegetativen Formen. Ob er nun zweckmäßig ist, die maximale Lysinbildung mit dem Nachweis der größten Hämolysinmenge im Kulturfiltrat zusammenzuziehen, erscheint nach dem soeben Mitgeteilten höchst fraglich. Weitere auf die Beantwortung dieser Frage abzielende Versuche sind daher dringend nötig, um klarzustellen, ob es sich in allen diesen Fällen der Lysinbildung um eine echte Sekretion der Hämolysine durch die lebenden Zellen handelt oder ob erst beim Absterben derselben oder bei der Bildung bestimmter Entwicklungsphasen die hämolytischen Stoffe frei werden. Nach den bisherigen Untersuchungen läßt sich eine Entscheidung kaum treffen.

In Bouillonkulturen des Bacillus typhi läßt sich ein Hämolysin nachweisen, welches besonders bei leicht alkalischer Reaktion dieses Nährsubstrates gebildet wird. Für dasselbe konnten E. und P. Levy ein Antiserum erhalten, das ohne Schaden eine Erwärmung auf 56° C überdauert.

Choleravibrionen und choleraähnliche Vibrionen produzieren ebenfalls mehr oder minder intensiv Hämolysine. Im allgemeinen kann man mit Meinicke feststellen, daß diese besonders bei der Zucht in Nährbouillon mit einem Zusatz von 2—2.3 g kohlensaurem Natron auf 1 Liter gebildet werden. Diese Menge Natriumkarbonat wird dabei der mit Lakmus als Indikator genau neutralisierten Bouillon zugesetzt. Die Peptonwasserkulturen ergeben eine geringere Menge Lysin. Bei der Lysinproduktion der Vibrionen scheint ihre Virulenz gar keine Rolle zu spielen. Im allgemeinen erweisen sich die Kulturfiltrate weniger hämolytisch wirksam, als die Kulturen selbst, womit aber nicht gesagt sein soll, daß vielleicht durch das Tonfilter ein größerer Teil des Hämolysins zurückgehalten wird. Für das Vibriolysin kann durch Injektion desselben in Kaninchen ein sehr wirksames Antilysin gewonnen werden, das innerhalb sehr kurzer Zeit sowohl an Erythrozyten gebundenes Hämolysin als auch freies Lysin neutralisiert und unwirksam macht.

Auch aus Streptokokkenkulturen[1]) wurden Hämolysine bekannt. Ruediger fand besonders gute Streptocolysin-Bildung bei der Zucht auf Blutserum. Auch dieses Hämolysin ist sehr empfindlich und wird bei 65—70° C in kürzester Zeit zerstört. Nach Lewin findet in saurer Nährflüssigkeit und im Pferdeserum keine Bildung desselben statt. Reber konnte bei zahlreichen Vaginalstreptokokken Hämolysin nachweisen. Das Streptokokkenhämolysin wird augenscheinlich in den lebenden Zellen zurückgehalten und von diesen nicht nennenswert ausgeschieden, wenn auch Kulturfiltrate dasselbe enthalten. Dies zeigen die Versuche von Schlesinger, die mit gewaschenen Streptokokken angestellt wurden. Wenn die als Waschflüssigkeit verwendete Kochsalzlösung sich bereits als frei von Lysinen erwies, konnte aus den gewaschenen Zellen durch

[1]) Vgl. Schlesinger, Zeitschr. f. Hygiene, Bd. 44, 1903; hier Literatur über Streptokokkentoxine.

Zerreiben derselben noch Hämolysin gewonnen werden. Dies spricht sehr für die früher aufgestellte Annahme, daß im allgemeinen die bakteriellen Hämolysine von den lebenden Bakterienzellen nicht in die Kulturflüssigkeit abgesondert werden, sondern erst nach dem Tode der Bakterien diese verlassen.

Antistreptocolysin findet sich im Serum vieler Tiere. Desgleichen besitzt das Antistreptokokkenserum hemmende Eigenschaften für das Hämolysin der Streptokokken.

Auch für den Anthraxbacillus wurde durch Casagrandi[1]) eine geringe Hämolysinbildung bekannt. Dem genannten Autor gelang es aber nicht, mit dem Buchner'schen Preßverfahren oder unter Anwendung besonderer Nährsubstrate nennenswerte Hämolysinmengen zu gewinnen. Wunschheim[2]) konnte ausnahmsweise mit dem Kulturfiltrat von Bouillonkulturen des Anthraxbazillus geringe Hämolysinwirkung erhalten.

Die bisher besprochenen bakteriellen Hämolysine sind nicht hitzebeständig und werden durch eine Erwärmung auf 56° C innerhalb kurzer Zeit unwirksam. Es wurden aber auch Lysine von Bakterien bekannt, die eine größere Hitzebeständigkeit besitzen.

Eine vermittelnde Stellung nimmt in dieser Beziehung das Hämolysin der Hühnercholerabazillen ein, das Calamida einer Untersuchung unterzog. Das Filtrat einer Nährbouillonkultur dieser Bakterien, durch Filtration mit Berkefeldfiltern erhalten, erweist sich stark hämolytisch. Es löst besonders stark die Erythrozyten des Kaninchen- und Meerschweinchenblutes, während es die roten Blutkörperchen des Huhnes nur wenig angreift. Es wird erst durch eine halbstündige Erhitzung auf 70° C vernichtet. Durch eine ebenso lange Erwärmung auf 58° erfährt es überhaupt keine Schädigung.

Noch bedeutend hitzebeständiger ist das Hämolysin des Bacillus pyocyaneus, das Pyocyanolysin. Dasselbe läßt sich durch Filtration von mehrtägigen Bouillonkulturen gewinnen. Es wirkt auf die roten Blutkörperchen des Ochsen, des Schafes, der Katze, des Hundes, der Ratte, der Maus, des Kaninchens, des Affen und des Menschen. Das Pyocyanolysin erträgt eine längere Erhitzung über 100° C ohne Schaden und wird erst durch die Einwirkung einer Temperatur von 120° C durch eine halbe Stunde vernichtet. Nach den Untersuchungen von Wenigeroff gelingt übrigens eine Trennung des Toxins vom Pyocyanolysin dadurch, daß man das Kulturfiltrat durch 24 Stunden bei 37° C einer Verdauung durch den Magen- oder Pankreassaft des Hundes unterzieht. Dabei wird das Pyocyanolysin zerstört, während das Toxin erhalten bleibt. Nach McIntyre kann das Hämolysin durch physiologische Kochsalzlösung aus den Pyocyaneusbazillen ausgezogen werden, während das Toxin dieser Bakterienart dadurch nicht extrahiert und nur mit 1 proz. Schwefelsäure aus den Zellen gelöst wird. Dies deutet entschieden auf eine tiefere Verschiedenheit zwischen Toxinen und bakteriellen Hämolysinen.

Besonders erwähnt sei noch das Hämolysin „Colilysin", das H. Kayser einer Untersuchung unterzog. Auch dieses Lysin zählt zu den hitzebeständigen Enzymen, denn es erträgt eine halbstündige Erhitzung

---

[1]) Casagrandi, Annali d'igiene sperim., Vol. 12.
[2]) Wunschheim, Archiv f. Hyg., Bd. 54, 1905.

auf 120° C ohne Schaden. Es wirkt vornehmlich auf die Erythrozyten des Hundes, denen in der Reihenfolge der abnehmenden Empfindlichkeit geordnet, diejenigen des Pferdes, Rindes und Kaninchens folgen. Für das Colilysin fanden sich besonders im Blutserum des Menschen und des Pferdes sehr stark wirkende natürliche Antilysine. Durch Einspritzen von Kulturfiltraten konnten künstliche Antilysinsera erhalten werden. Mit diesen Antikörpern konnte eine bereits in Gang befindliche Hämolyse aufgehalten werden, — ein Vorgang, der auch für eine Reihe anderer bakterieller Hämolysine bekannt wurde.[1])

Aus dem über die Bakterienhämolysine bekannt gewordenen ist zu entnehmen, daß ein tieferer Unterschied zwischen ihnen eigentlich nur in Bezug auf ihre Hitzebeständigkeit und ihr Verhalten gegen spezifische Antilysinsera besteht. Wir können demnach die bakteriellen Hämolysine in zwei große Gruppen trennen, eine thermolabile und eine thermostabile. Erstere umfaßt alle Bakterienhämolysine, die durch eine halbstündige Erwärmung auf 56° ihrer Wirkung beraubt werden. Letztere schließt jene bakteriellen Hämolysine ein, die erst durch eine Erhitzung auf 100° und darüber vernichtet werden. Beide Gruppen verbindet das Hämolysin des Hühnercholerabazillus, das durch eine Erwärmung auf 60° C geschwächt und erst durch Erhitzen auf 70° C vernichtet wird. In Bezug auf die künstlichen Antilysinsera verhalten sich die Hämolysine der einzelnen Bakterienarten insofern spezifisch und verschieden, als durch Einspritzen eines bestimmten bakteriellen Lysins ein Immunserum gebildet wird, das nur gegen das immunisierende Enzym wirkt oder wenigstens nur gegen die Hämolysine nächstverwandter Bakterienarten. So erweist sich das Antistaphylolysin, gewonnen durch Injektionen von Kulturfiltraten des Staphylococcus pyogenes aureus, als wirksam gegen jedes Staphylolysin, also auch gegen dasjenige von Staphylococcus pyogenes albus. Diese Verhältnisse legen allerdings die Annahme nahe, daß die von den einzelnen Bakterienarten erzeugten Lysine in der Tat verschiedener Natur sind. Es ist natürlich nicht zu entscheiden, wie tief der Unterschied ist, solange die Konstitution der Hämolysine und deren chemische Beschaffenheit nicht ermittelt ist. Rein dargestellt hat man zurzeit noch kein Hämolysin.

Nach Ehrlich und Madsen ist die Konstitution der bakteriellen Hämolysine, insonderheit des Tetanolysins und Staphylolysins, derjenigen des Diphtherietoxins sehr ähnlich. Demnach haben wir in dem Molekül Hämolysin ein Haptin zweiter Ordnung zu erblicken, das eine haptophore und zymophore Gruppe besitzt. Erstere ist die stabilere, da eine Vernichtung oder Veränderung der zymophoren Gruppe noch keineswegs die Wirkung der haptophoren Gruppe schädigt. Durch Erwärmen unwirksam gemachte Hämolysine haben ihre Bindungsfähigkeit an das rote Blutkörperchen bewahrt. Schon die Tatsache des Vorhandenseins zweier so verschieden labiler Gruppen bedingt die gleichzeitige Annahme einer komplexen Natur der bakteriellen Hämolysine. Ob nun die Kompliziertheit des Lysinmoleküls so groß ist, wie es die Annahme Ehrlichs von einer Reihe der mit verschiedenen Aziditäten ausgestatteten Partialgifte erheischt, scheint zumindest sehr fraglich. Die Tatsache, daß durch den Zusatz bestimmter Antilysinmengen gewisse Komponenten desselben zuerst gesättigt

---

[1]) Vgl. Kraus, R., und Lipschütz, B., Zeitschr. f. Hygiene, Bd. 46, 1904.

werden, die sich in Bezug auf ihre lytische Kraft wesentlich verschieden verhalten, erfordert keineswegs zur Erklärung die Annahme von vielen Giftkomponenten, wie uns die schönen Ausführungen über die Neutralisation des Ammoniaks durch Borsäure als Analagon für die Neutralisation des Lysins durch das Antilysin in Svante Arrhenius' „Immunochemie" zeigen.[1]) Es bedarf noch eingehender Untersuchungen auf diesem Gebiete, um nur einigermaßen eine Klärung in die Konstitutionsfragen der bakteriellen Hämolysine zu bringen. Erschwert werden diese Arbeiten durch die Labilität der Lysine, zumindest ihrer zymophoren Komplexe, die einer fortwährenden Veränderung unterliegen und in unwirksame Modifikationen, Lysoide[2]), übergehen.

Den bakteriellen Hämolysinen nächst verwandt sind diejenigen Enzyme von Bakterien, die eine Auflösung von weißen Blutkörperchen oder von arteigenen und artfremden Bakterienzellen herbeiführen. Es ist dies vor allem das Leukozidin Vandeveldes, das sich in Staphylokokkenkulturen nachweisen läßt und über dessen Wirkungsweise eingehendere Untersuchungen von Neisser und Wechsberg vorliegen. Durch die Wirkung dieses Enzymes werden die weißen Blutzellen in eigentümlicher Weise verändert und getötet. Zuerst zeigt deren Inhalt eine Granulierung. In der Folge findet eine Lösung der Granula statt. Am längsten widersteht der Kern, der zuletzt verschwindet. Innerhalb von zwei Minuten spielt sich dieser ganze Vorgang ab, so daß nach dieser Zeit vom weißen Blutkörperchen nur mehr eine leere Blase übrig ist. Das Leukozidin gehört zu den wärmeunbeständigen Lysinen, denn eine zwanzig Minuten dauernde Erwärmung bei 50° C reicht aus, dasselbe unwirksam zu machen. Durch Impfungen von Tieren mit Staphylokokkenkulturfiltrat gelingt es, ein wirksames Antileukozidin im Serum des betreffenden Tieres zu erhalten. Das normale Pferde- und Menschenblutserum enthält ebenfalls nennenswerte Mengen von Antikörpern des Leukozidins.

In diese Gruppe von Lysinen gehört auch die Pyocyanase von Emmerich und Löw, deren Enzymnatur von verschiedenen Seiten bestritten wurde. Aus der ganzen Wirkungsweise dieses Stoffes erscheint dessen Zurechnung zu den Enzymen dennoch gerechtfertigt. Die Pyocyanase entsteht in Kulturen des Bacillus pyocyaneus und richtet ihre Wirkung gegen Bakterienzellen, sowohl arteigene als artfremde. Trübe Bakterienaufschwemmungen oder stark getrübte Kulturen werden nach Zugabe des Kulturfiltrates von Bacillus pyocyaneus in kurzer Zeit vollständig aufgehellt und geklärt. Die Bakterien werden dabei aber nicht vollständig gelöst, sondern es scheinen bestimmte Zellelemente der Lysis anheimzufallen, wodurch die Zelle in einzelne Körnchen zerteilt wird. Wie schon angedeutet, handelt es sich bei der Bakteriolyse um eine echte Enzymwirkung, zumal hier ebenfalls nur ein Prozeß beschleunigt wird,

---

[1]) Es sei auf diese Schrift von Sv. Arrhenius besonders hingewiesen, die trotz Anfechtung von verschiedenen Seiten sehr vieles enthält, das der eingehendsten Beachtung bei der Beurteilung der Enzymwirkungen wert ist und das hier leider nicht weiter behandelt werden kann. Hier auch reichliche Literatur über die einschlägigen chemisch-physikalischen Untersuchungen.

[2]) Aschoff, Ehrlichs Seitenkettentheorie usw., Jena 1905; Volk und Lipmann, Wiener klin. Wochenschr. 1903. Dann die bei den einzelnen bakteriellen Hämolysinen genannten Autoren.

der spontan ebenfalls eintritt und sehr langsam verläuft. Außerdem ist die Wirkung der Pyocyanase proportional der Zeit und der Konzentration und umgekehrt proportional der Bakterienmenge, die zur Lösung gelangt, Verhältnisse, die sich bei den Enzymen im allgemeinen zeigen. Daß die Pyocyanase eines der hitzebeständigsten Lysine ist, kann gegen die Annahme der Enzymnatur derselben nicht verwendet werden, da thermostabile Enzyme bereits bekannt sind. Die Pyocyanase erträgt ohne Schaden eine halbstündige Erhitzung im strömenden Dampf von 100°.

Auch in Kulturen von Bacillus prodigiosus konnten Loew und Kozai ein bakteriolytisches Enzym nachweisen.

Nach Emmerich und Löw haben wir die verschiedenen bakteriolytischen Bakterienenzyme in der Gruppe der „Nukleasen" zu vereinigen, da durch sie die Nukleoproteide der Bakterienzellen in Lösung gebracht werden. Wir haben nunmehr noch zu rechtfertigen, warum wir die Bakterienlysine überhaupt den proteolytischen Enzymen angeschlossen haben, wenn auch eine Lösung des Scheibenplasmas und bei rascher Hämolyse eine Zerteilung der Blutzellen in Fragmente von Camaniti festgestellt worden war. Es liegt hier doch keine tiefere Spaltung von Eiweißsubstanzen vor, wie wir sie bei der Wirkung der Bakterienproteasen kennen gelernt haben. Verschiedentlich wurde schon angedeutet, daß zumindest bei den bakteriellen Hämolysen eine Zerlegung des roten Blutkörperchens in Hämoglobin und restierende Zellsubstanz statthat. Da in diesem Falle die gespaltenen Substanzen protoplasmatischer, eiweißartiger Natur sind, liegt es nahe, diese Lysine den proteolytischen Enzymen zumindest anzuschließen. Anderseits ist eine Verwandtschaft der bakteriellen Hämolysine mit den Bakterientoxinen nicht zu leugnen und letztere werden dadurch den Enzymen um vieles näher gerückt.[1])

[1]) Vgl. Oppenheimer, Die Fermente.

VIII.

Fortsetzung der proteolytischen Bakterienenzyme.

Bakterienkoagulasen.

Die Koagulasen oder Gerinnungsenzyme sind dadurch charakterisiert, daß durch ihre Wirkung gelöste komplizierte Körper in unlösliche Modifikationen übergehen, die dann in gröberer oder feinerer Form ausfallen. In diese Gruppe von Enzymen gehören das Lab oder Chymosin, das Fibrinenzym oder die Thrombase, das Myosinenzym und endlich die Pektase. Von diesen Enzymen ist im Reiche der Bakterien nur das Lab weit verbreitet, weshalb nur auf dieses näher eingegangen werden soll, soweit es sich um Bakterienlab handelt.

Schon Duclaux konnte bei Fadenpilzen und Mikroorganismen Chymosinwirkungen nachweisen. Auch Wood konnte das Lab bei einer Anzahl von Bakterien feststellen, die auch Proteasen erzeugten. In der Folge wurde bei einer großen Anzahl von Bakterienarten die Bildung von Chymosin festgestellt.

Vorerst soll das Labenzym in seiner Wirkung und in seinen Eigenschaften kurz erörtert werden.[1]) Wir verdanken Hammarstens grundlegenden Untersuchungen über die Labgerinnung der Milch einigen Einblick in die Labwirkung. Darnach ist eine scharfe Trennung der Säurefällung des Kaseins und der Labgerinnung desselben aufrecht zu erhalten. Die erwiesenermaßen untereinander verschiedenen Labenzyme äußern nur auf das Kasein eine Wirkung, die in einer geringen hydrolytischen Spaltung liegen soll. Dies würde allerdings die Auffassung des Labes als proteolytisches Enzym vollauf rechtfertigen. Nach weiteren Untersuchungen von Fuld soll nun die Labgerinnung in einer Umwandlung des gesamten Kaseins in Parakasein bestehen, worauf erst als sekundärer Vorgang die Fällung erfolgt. Eine hydrolytische Spaltung des Parakaseins in Albumosen sei aber der Tätigkeit anderer proteolytischer Enzyme zuzuschreiben. Bei dem Umwandlungsprozeß des Kaseins in Parakasein findet eine vorübergehende Bindung des Labes an das Kasein statt. Nach der Umwandlung wird dasselbe wieder frei und ist dementsprechend in der Flüssigkeit

---

[1]) Ausführliches samt einschlägiger Literatur findet sich darüber in Oppenheimers Monographie der Fermente und bei Green-Windisch, Die Enzyme. Außerdem sei auf die bekannten Handbücher der physiologischen Chemie verwiesen.

wieder vorhanden und nachweisbar. Durch eine Reihe von Versuchen ist dargetan, daß die Fällung des Parakaseins in der Tat ein vom Labenzym unabhängiger Vorgang ist. Immerhin können wir das Labenzym wenigstens den proteolytischen Enzymen anschließen, denn eine direkte Einordnung in diese Gruppe erscheint zurzeit nicht angebracht.

Die Labkaseinfällungen in der Milch unterscheiden sich von den übrigen Kaseinfällungen dadurch in augenfälliger Weise, daß erstere nach Wiederauflösung nicht mehr mit Lab fällbar sind, während letztere nach Belieben gelöst und wieder gefällt werden können. Bei der Labfällung wird also das Kasein in der Tat verändert, während es bei Fällung mit schwachen Säuren oder Salzen unverändert niedergeschlagen wird.

Das Labenzym ist nach der Konzentration und der Reaktion der Scheinlösung desselben verschieden widerstandsfähig gegen Erwärmen. In konzentrierteren Lösungen liegt die Zerstörungstemperatur um 70° C. Das in Form eines trockenen Pulvers dargestellte Lab ist weitaus hitzebeständiger. Gegen sehr niedrige Temperaturen scheint es unempfindlich zu sein. Die optimale Wirkung entfaltet es bei 39—42° C. Nach Hammersten kann reines Lab, das ebenfalls noch nicht dargestellt wurde, die 4—800000fache Menge Kasein in Parakasein umwandeln. Dabei ist das Produkt aus der Gerinnungszeit und der Labmenge konstant. Nach Fuld scheint eine direkte Proportionalität zwischen der Reaktionszeit und der Kaseinmenge zu bestehen. Das Lab wirkt sowohl bei leicht alkalischer, als auch bei schwach saurer Reaktion.

Wie die anderen Enzyme ist auch das Lab gegen größere Säure- oder Alkalimengen empfindlich. Die einzelnen Antiseptika wirken ebenfalls schädigend auf das Chymosin. Am wenigsten hindernd erweisen sich noch Chloroform, Jod, Salizylsäure, Karbolsäure und Senföl, weshalb sich gerade diese Antiseptika für bakterienfreie Labversuche besonders eignen. Über die schädliche Wirkung des Formaldehydes gehen die Meinungen auseinander, doch wegen seiner erwiesenen Schädlichkeit für die Proteasen erscheint es wahrscheinlich, daß es auch auf Chymosin schon in geringen Mengen zumindest hemmend wirkt.

Nach den Untersuchungen von Morgenroth enthält das Blutserum und die Milch von den mit Lab immunisierten Tieren ein Antilab, das nur auf tierisches Lab hindernd zu wirken vermag und pflanzliches Lab nicht neutralisiert. Umgekehrt konnte Morgenroth durch Impfung von Tieren mit Cynarase, dem Labenzym der Artischocken, im Serum derselben eine spezifische Anticynarase erhalten, die nur auf pflanzliches Lab wirkte und die Labung durch tierisches Chymosin nicht hinderte. Diese Spezifizität läßt jedenfalls einen tieferen Unterschied zwischen tierischem und pflanzlichem Lab vermuten.

Wichtige Aufschlüsse über die Lichtwirkung auf Chymosin, Chymosinogen und Antichymosin brachten uns die Untersuchungen von Schmidt-Nielson. Er arbeitete mit konzentriertem, elektrischem Bogenlicht in einer Intensität, wie sie in Finsens Lichtinstitut für therapeutische Zwecke benutzt wird. Zur Verwendung kamen kleine Quarzkuvetten. Es ergab sich, daß die ultravioletten Strahlen auf Chymosin zerstörend

wirken, während die übrigen Strahlen keine nennenswerten Wirkungen äußern.

Für das Vorkommen eines labartigen Enzymes bei zahlreichen Bakterien spricht schon die längst bekannte Tatsache, daß die Milch ohne Säuerung oder bei einer für die Gerinnung nicht genügenden Säuerung gerinnt. Schon im Jahre 1852 machte Haubner diese Beobachtung, die in der Folge mehrfache Bestätigung fand. Nach den Untersuchungen von Fitz und Hueppe vermag der Bacillus butyricus (Amylobacter) das Kasein der Milch in der Weise zu zersetzen, daß dasselbe erst zur Gerinnung kommt und später weiter gespalten wird. Die Spaltungsprodukte sind löslich und enthalten Tyrosin, Leucin und endlich Ammoniak. Die Gerinnung erfolgt bei leicht alkalischer Reaktion der Milch. Flügge wies bei einer Reihe von peptonisierenden Milchbakterien labende Wirkungen nach. Auch Wood untersuchte eine größere Anzahl von Bakterienarten auf ihre proteolytischen Enzyme und konnte dabei labartige Enzyme beobachten.

Fokker nimmt in Cholerakulturen für die Milchgerinnung ein labartiges Enzym an. Schoffer erbrachte den Nachweis, daß die Vibrionen der Cholera die Milch durch ein labartiges Enzym zur Gerinnung bringen, da die von diesen beim Wachstum in Milch gebildete Säuremenge nicht ausreicht, die Gerinnung herbeizuführen. Außerdem züchtete Schoffer Choleravibrionen in Milch, die kohlensaure Magnesia enthielt. Von diesen Kulturen wurden 2—3 ccm in frische Milch gebracht und auf 60° C erwärmt, worauf rasch Gerinnung eintrat. Daß hier eine Enzymwirkung vorlag, geht daraus hervor, daß Kochen der Cholerakulturen ihre milchkoagulierenden Eigenschaften vernichtete. Mit Alkohol oder mit der später zu beschreibenden Conn-Blumenthal'schen Methode gelang eine Fällung von labenzymhaltigen Niederschlägen.

Warrington wies in den Kulturen des Bacillus fluorescens liquefaciens und des Vibrio cholerae Labenzyme nach, die Vignal auch beim Bacillus mesentericus vulgatus beobachten konnte. Im allgemeinen wurden bei den gelatine-verflüssigenden Mikroben labende Wirkungen nachgewiesen. Dies berechtigt zum Verdacht, daß die früher beschriebenen Bakterienproteasen gleichzeitig Labwirkungen entfalten. Dagegen spricht aber wieder die Tatsache, daß durch Zusatz von geringen Säuremengen, auch Karbolsäure, die Labwirkung unterdrückt wird, während die proteolytischen Enzyme ihre Tätigkeit ungehindert entfalten. Es war ja noch nicht gelungen, eine Trennung der Proteasen vom Lab durchzuführen, denn die Methoden der Anfertigung von Kulturfiltraten ergaben im Filtrat alle in der Kulturflüssigkeit gelösten Enzyme. Auch durch Fällungen konnte eine Trennung nicht erreicht werden, da die üblichen Fällungsmittel, in den nötigen Konzentrationen angewendet, wieder sämtliche Enzyme niederrissen.

Erst Conn[1]) gelang eine einigermaßen vollständige Trennung durch die Anwendung folgender Methode. Die auf Lab zu untersuchenden Mikroorganismen wurden in sterilisierter Milch gezüchtet. Nach 8—10 Tagen nach dem Gerinnen der Milch wurde destilliertes Wasser in geringer Menge zugesetzt, gut geschüttelt und die Kultur durch ein Porzellanfilter filtriert. Weiter behandelte Conn das Filtrat nach der Blu-

---

[1]) Conn, H. W. Zentralbl. f. Bakt., I Abt., Bd. 12, 1892.

menthal'schen Methode der Labpepsintrennung. Darnach wurde dasselbe mit 0,1 proz. Schwefelsäure schwach angesäuert und mit einem Überschuß von Kochsalz versetzt, sodaß ein ungelöster Salzrückstand verbleibt. Es scheidet sich an der Oberfläche ein schneeweißer Schaum ab, der ein verhältnismäßig reines Lab darstellt. Dieses kann in Wasser gelöst und durch Dialyse salzfrei gemacht werden. Doch auch diese Trennungsmethode führte nicht zu einer vollständigen Isolierung der labenden Substanz, denn die restierende Flüssigkeit enthielt neben den fast vollständig in Lösung gebliebenen proteolytischen Enzymen noch etwas Lab und der weiße Schaum, bezw. das durch Trocknen desselben gewonnene Labpulver war mit geringen Mengen von Proteasen verunreinigt. Ob darin nicht noch andere Enzyme vorhanden sind, wurde nicht untersucht.

Wie schon mitgeteilt, ist also ein dem tierischen Chymosin analog wirkendes Enzym bei den Bakterienarten weit verbreitet. Besonders die peptonisierenden Milchbakterien sind nach den Untersuchungen von Gorini[1]), Kalischer und Conn durch eine kräftige Labwirkung ausgezeichnet. Gorini[2]) konnte dann bei Bacillus prodigiosus und später[3]) bei Bacillus indicus, Proteus mirabilis und Ascobacillus citreus labende Wirkungen nachweisen. Conn[4]) züchtete aus bitter gewordener Milch einen ziemlich großen Mikrokokkus rein, der durch ein lösliches Enzym die Milch bei 35° C schon nach eintägigem Wachstum koagulierte. Margarete Breymann gelang es, aus größeren Mengen von Kulturrasen des auf Kartoffelscheiben gezüchteten Bacillus pyocyaneus ein Pulver zu gewinnen, das neben proteolytischen Enzymen auch wirksames Lab enthielt. Tissier und Martelly wiesen beim Proteus vulgaris Labenzym nach. Loeb erhielt bei der Zucht des Staphylococcus quadrigeminus Czaplewski auf Milchagarplatten unmittelbar um den Impfstrich eine deutliche Aufhellung, dagegen im weiteren Umkreise davon eine dunklere, undurchsichtigere Zone von ausgefälltem Kasein, dessen Fällung auf ein Labenzym zurückzuführen ist. Endlich konnten Boekhout und Ott de Vries bei einer peptonisierenden Milchsäurebakterie neben der Milchsäuregärung auch eine labende Wirkung durch Versuche feststellen.

Aus allen Untersuchungen ist der allgemeine Schluß zu ziehen, daß die Bildung des Bakterienlabes sehr weit verbreitet und unabhängig von der Reaktion und Produktion anderer Enzyme ist. Diese Schlußfolgerung bedarf zwar einer kleinen Einschränkung insofern, als bei sehr intensiver Säure- oder Proteasenproduktion die Labbildung zurückgeht oder aber das gleichzeitig erzeugte Lab seine Wirkungsfähigkeit einbüßt.

Es wird auf den verschiedenen eiweißhaltigen Substraten von den einzelnen Bakterienarten in mehr oder minder großer Menge gebildet und scheint von der Zelle ziemlich stark zurückgehalten zu werden. Über die Zeit des Entstehens der Labenzyme in der Milch und in den mit Milchzucker versetzten Bouillonkulturen differieren die Ansichten, indem Duclaux nach seinen Beobachtungen angibt, daß dasselbe am meisten

[1]) Gorini, Zentralbl. f. Bakt., II. Abt., Bd. 8, 1902.
[2]) Gorini, Atti dei laborat. d. sanità publ. Roma 1890. Hygien. Rundschau 1893. Rivista d'Igiene, Vol. IV, 1893.
[3]) Gorini, Giornale d. R. Soc. Ital. d'Igiene, Vol. XVI, 1891.
[4]) Conn, Zentralbl. f. Bakt., I. Abt., Bd. 9, 1891.

in den ersten Wachstumszeiten gebildet wird, während Gorini[1]) das Maximum der Bildung in die Zeit zwischen den 3. und 10. Wachstumstag verlegt. Beide Autoren arbeiteten nicht mit identischen Bakterienarten. Außerdem ist dabei allem Anscheine nach auch die Vermehrungsgeschwindigkeit und die Züchtungstemperatur maßgebend. Für die beste Labbildung werden im allgemeinen Temperaturen zwischen 20 und 27° C angegeben, während bekanntlich die optimale Produktion von proteolytischen Enzymen bei höherer Temperatur einsetzt. Außerdem kann bei der Untersuchung der Labkraft von Kulturfiltraten nur das in die Kulturflüssigkeit bereits übergegangene Lab in Wirkung treten, während das in den lebenden Zellen eingeschlossene Enzym der Untersuchung entgeht. Selbst nach dreitägigem Wachstum von Mikroben finden sich immerhin schon viele tote Zellen, die ihr Enzym abgegeben haben. Noch mehr Bakterien werden naturgemäß in den Kulturen jener Versuche zerfallen sein, die Gorini anstellte, nachdem er nach 1—2 wöchentlicher Zucht erst die Filtration derselben vornahm. Er fand in der Tat reichlich Lab. Aus allen diesen Versuchen kann der Schluß nicht gezogen werden, daß von den lebenden Bakterien das Lab sezerniert wird. Dagegen sprechen noch besonders die Untersuchungen von Levy und Pfersdorff. Sie konnten aus Kartoffelkulturrasen von Bacillus prodigiosus eine bedeutendere Menge labender Substanz gewinnen, wenn sie die Bakterienzellen mit Chloroform töteten, dann trockneten und pulverisierten. Dieses Pulver enthielt neben Invertin und Proteasen noch kräftig wirkendes Bakterienlab. Aber selbst mit diesen Methoden hatten sie nicht bei allen Bakterienarten Erfolg und erreichten die Gewinnung eines Labes beispielsweise beim Bacillus anthracis (asporogen) nur durch geschickte Ausnutzung der Autolyse. Sie versetzten Massenkulturen dieser Bakterienart mit Toluol und beließen sie durch vier Wochen im Brutschrank. Durch die autolytischen Vorgänge wurden gut erhaltene Enzyme in Freiheit gesetzt, darunter auch Labenzyme. Diese Befunde bekräftigen die Annahme, daß es sich bei dem Bakterienlab höchstwahrscheinlich um ein Endoenzym handelt, das mehr oder weniger leicht die tote Zelle verläßt. Eine zweite Möglichkeit ist allerdings auch zu berücksichtigen. Das Lab verläßt vielleicht gar nicht als wirksames Enzym die Bakterienzelle, sondern als unwirksame Vorstufe, als Proenzym oder als Labzymogen, das für das tierische Lab bereits von Hammarsten[2]) und Grützner angenommen wurde. Das Prochymosin geht aber erst durch anwesende Säuren oder saure Salze in das wirksame Enzym über. Für diesen Fall könnte natürlich unter fortdauernder alkalischer Reaktion im Nährsubstrat der übliche Nachweis negativ ausfallen, zumal nach den Untersuchungen von Glässner gerade das Zymogen des Labes schwerer Porzellanfilter durchsetzt. Demnach ist die Frage, ob es sich beim Bakterienlab um ein von der lebenden Zelle sezerniertes Enzym handelt oder nicht, zurzeit unentschieden.

Die Bakterienlabwirkung auf Milch ändert sich nun beträchtlich nach der Versuchsanordnung. Nach den Untersuchungen von Loeb über das Lab des Staphylococcus quadrigeminus und einer aus einer Pyonephrose isolierten Proteusart geht hervor, daß man mit allmählich steigender Kulturfiltratdosis nur dann eine gleichmäßig zunehmende Labung

---

[1]) Gorini, Zentralbl. f. Bakt., I. Abt., Bd. 12, 1892.
[2]) Hammarsten, Lehrbuch der physiologischen Chemie, 1896.

bei gleichem Kaseingehalt erhält, wenn man die Proben unmittelbar nach der Mischung in die für die Labwirkung günstige Temperatur von 37° C bringt. Kommen die Proben aber nach dem Mischen in den Eisschrank und werden dann erst bei 37° C gehalten, so tritt die Labung mit den größten und größeren Kulturfiltratdosen nicht ein. Diese konnte nur dann erreicht werden, wenn die Proben nach der Kälteeinwirkung unmittelbar in eine höhere Temperatur (45° C) kamen oder wenn nach der Mischung eine Einfrierung folgte. Es hat sich bei den weiteren Versuchen des genannten Forschers herausgestellt, daß die Ursache für den negativen Ausfall der Labung bei großen Kulturfiltratdosen in dem gleichzeitig vorhandenen Bakterientrypsin zu suchen ist. Sobald eine gewisse Menge dieser Protease zugegen ist, wirkt es hinderlich auf die Labung. Dabei spielt das relative Verhältnis zwischen Lab und Protease keine Rolle, das ja in den Verdünnungen nicht geändert ist, sondern nur die absolute Menge. Daß die unmittelbar nach dem Mischen bei 37° C gehaltenen Proben keine unregelmäßigen Labungsreihen aufweisen, hat wahrscheinlich seinen Grund in dem verschiedenen Verhalten beider Enzyme bei dieser Temperatur. Vielleicht erfolgt die intermediäre Bindung zwischen Kasein und Lab in der höheren Temperatur viel rascher als zwischen Kasein und Protease.

Gorini hat sich eingehend mit dem Labenzym des Bacillus prodigiosus befaßt und gezeigt, daß es besonders reichlich bei 20° C von dieser Bakterienart gebildet wird, während bei der Zucht um 37° C die Produktion des proteolytischen Enzymes in den Vordergrund tritt. Das Prodigiosuslab zeichnet sich durch eine besondere Widerstandskraft gegen Hitze aus, da es nach den Angaben von Gorini erst nach halbstündigem Erhitzen auf 100° C zerstört wird.

Hata unterzog die Enzyme des Bacillus prodigiosus und des Bacillus fluorescens liquefaciens einer genaueren Untersuchung und konnte ein eiweißkoagulierendes und milchkaseinfällendes Enzym nachweisen. Er benutzte zur Darstellung nicht die Blumenthal'sche Trennungsmethode, sondern verfuhr dabei folgendermaßen: beide Bakterienarten wurden in steriler Milch gezüchtet und dann die Kultur filtriert. Das Filtrat wurde bei 50° C auf Syrupdicke eingeengt und dann mit Alkohol bis zur Bildung eines mäßigen Niederschlages versetzt. Nach Abfiltrieren des letzteren wurde das Filtrat mit absolutem Alkohol im Überschuß gefällt und der abfiltrierte Niederschlag nochmals in Wasser gelöst und mit Schwefelammonium behandelt. Der entstehende Niederschlag enthielt die proteolytischen und labenden Enzyme. Letztere konnten durch wiederholte Lösung und Fällung einigermaßen gereinigt werden. Zum Nachweis der Labwirkung diente mit 1 proz. Karbolsäure versetzte Milch. Die Enzyme erwiesen sich als ziemlich widerstandsfähig gegen Erwärmen. Die Fluorescens-Koagulase wurde durch Erhitzen auf 100° C ohne Beigabe eines Antiseptikums zwar geschwächt, aber nicht vernichtet. Fast ebenso verhält sich die Prodigiosuskoagulase, denn sie wurde bei 100° C zwar etwas stärker geschädigt, war aber immerhin noch wirksam.

Die Untersuchungen von Hata geben uns noch wertvolle Aufschlüsse über die quantitativen Verhältnisse der Produktion von Lab und proteolytischem Enzym bei diesen beiden Bakterienarten. Danach bildet Bacillus fluorescens liquefaciens mehr Lab als proteolytisches Enzym. Hata unternahm geradenwegs Messungen beider Enzyme, aus

denen sich folgende Zahlen ergeben. Das Enzym des Bacillus prodigiosus enthält im Gramm 280000 Trypsin- und 150000 Chymosineinheiten, während das Enzym von Bacillus fluorescens liquefaciens in derselben Menge nur 90000 Trypsineinheiten, aber 380000 Labeinheiten aufwies. Dazu ist zu bemerken, daß man unter einer Trypsineinheit diejenige Menge Enzym versteht, die eben ausreicht, 2 ccm 10 proz. Thymolgelatine bei 35° C derart innerhalb von 24 Stunden zu beeinflussen, daß sie auch im Eisschrank nicht mehr erstarrt. Die Labeinheit vermag in 24 Stunden 2 ccm Milch mit einem Zusatz von 1 proz. Karbolsäure bei 35° C eben vollständig zur Gerinnung zu bringen.

Für die labenden Enzyme der Bakterien wurde im normalen Blutserum zahlreicher Tiere ebenfalls ein mehr oder weniger wirksames Antilab gefunden. Besonders reich daran ist das Serum des Pferdeblutes. Viel energischer hemmende Sera erlangt man aber durch Immunisierung von Tieren mit den Bakterienkoagulasen.

Die Befunde mit dem Labenzym des Bacillus prodigiosus und auch des Bacillus fluorescens liquefaciens legen den Gedanken an einen Vergleich dieser Koagulasen mit dem Parachymosin[1]) des Tierreiches nahe. Das Parachymosin unterscheidet sich vom Chymosin in erster Linie dadurch, daß es gegen Alkalien empfindlich ist und in sehr kleinen Mengen überhaupt nicht mehr wirkt. Außerdem ist es hitzebeständiger, denn es behält seine Wirksamkeit bei 75° C. Die beiden letzteren Eigenschaften finden wir beim Lab des Bacillus prodigiosus und Bacillus fluorescens liquefaciens wieder und es liegt nahe, die Bakterienkoagulasen gerade mit dem Parachymosin in nähere Beziehungen zu bringen.

Bisher wurde bei den proteolytischen Bakterienenzymen nur ihre spaltende Tätigkeit einer eingehenderen Besprechung unterzogen. Es wurden aber auch Tatsachen bekannt, die für die Annahme einer synthetischen Leistung dieser Enzyme mit Vorsicht verwertet werden können. Es soll sich dabei um eine Rückverwandlung von minder tief zerlegten Spaltungsprodukten der Eiweißkörper handeln. Schon im Jahre 1886 machte Danilewsky die Beobachtung, daß Chymosin in klaren Peptonlösungen einen flockigen Niederschlag erzeugt. Die späteren Untersuchungen von Sawjalow darüber ergaben, daß besonders die Protoalbumose und Heteroalbumose gefällt werden, während die Deuteroalbumose nur sehr schwach und Peptone gar nicht mehr angegriffen werden. Der letztgenannte Autor nannte die Niederschläge Plasteïne. Spätere Untersuchungen von Kurajeff deckten ähnliche Wirkungen für das Papayotin auf. Wegen der Unterschiede in den Flälungen durch Chymosin und Papayotin bezeichnete Kurajeff die Papayotinplasteine als Koagulasen. Herzog[2]) konnte ebenfalls eine Koagulation durch die Einwirkung von proteolytischen Enzymen feststellen. Durch Zusatz von Pepsin, Trypsin oder Papayotin zu gesättigten Albumoselösungen erhielt er flockige Fällungen oder Gallerten. Damit ist eine Zunahme der inneren Reibung verbunden.

Unwillkürlich gemahnen diese Befunde an eine Überlegung der biologischen Bedeutung der proteolytischen Bakterienenzyme für die

---

[1]) Die einschlägige Literatur über Parachymosin findet sich bei Oppenheimer, Die Fermente. Leipzig 1903, S. 185 und 186.

[2]) Herzog, O., Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. 39.

Zelle. Sicherlich ist die proteolytische Spaltung der nicht diffusiblen Eiweißsubstanzen für die Assimilation von der größten Bedeutung. Nur auf diese Weise können die Eiweißkörper zu Nährmitteln für die Bakterienzelle werden. Dazu ist es aber unbedingt notwendig, daß die Proteasen aus der Zelle austreten. Es erhebt sich nun die für die .Biologie wichtige Frage, ob ein Austritt der proteolytischen Enzyme aus der lebenden Bakterienzelle möglich ist und wirklich stattfindet. Diese Frage erscheint aber bisher mit unbedingter Sicherheit nicht entschieden zu sein. Für die Erklärung so mancher Vorgänge ist die Annahme einer Endotryptase und einer Ektotryptase ein zweckmäßiges Auskunftsmittel. Es ist auch mit größter Wahrscheinlichkeit, sagen wir mit Sicherheit, erstere erwiesen, letztere aber keineswegs. Für die Erklärung der für die Aufnahmefähigkeit der Eiweißspaltungsprodukte notwendigen proteolytischen Spaltung bedürfen wir auch nicht der Annahme einer Sekretion der tryptischen Enzyme durch die lebende Zelle, wie folgende Überlegung zeigen soll. Wenn eine Bakterienzelle auf einen Eiweißkörper verimpft wird, der der proteolytischen Spaltung ohne weiteres zugänglich ist, so werden zunächst noch einige Zellteilungen ohne besonders große Nahrungsaufnahme möglich sein. In den natürlichen Verhältnissen wird immer noch eine Reihe zugänglicher, wenn auch minderwertiger Nährstoffe vorhanden sein. Das Gleiche gilt auch für die üblichen Laboratoriumsnährböden. Haftet doch schon an der übertragenen Bakterienzelle vom ursprünglichen Nährsubstrat etwas daran. Innerhalb sehr kurzer Zeit gehen nun schon einige der älteren Zellen zugrunde und verfallen der Autolyse. Aus der toten Zelle treten aber die proteolytischen Enzyme ungehindert aus und können dann ihre spaltende Wirksamkeit entfalten und so die indiffusiblen Eiweißkörper in diffusible Peptone und Albumosen zerlegen, die nun bereits assimilationsfähig sind und für die überlebenden Zellen einen ausgezeichneten Nährboden abgeben. Dadurch wird die Vermehrung mächtig angeregt und mit der massenhaften Zellproduktion geht auch ein Massensterben einher. Dadurch werden immer größere Mengen von proteolytischem Enzym in Freiheit gesetzt, wodurch innerhalb kurzer Zeit eine komplette Aufspaltung der Eiweißkörper erfolgt. Natürlich geht damit Hand in Hand eine Ansammlung von Stoffwechselprodukten der verschiedensten Natur, die in der Folge zur Tötung der gesamten Bakterien führen, sofern nicht für eine Entfernung derselben vorgesorgt ist oder die Bakterienart befähigt ist, sehr resistente Dauerformen zu bilden. Ein Beweis für die eben ausgeführte Annahme scheint darin zu liegen, daß viele Bakterienarten beim Wachstum auf erstarrtem Blutserum in den ersten Tagen kaum eine makroskopisch wahrnehmbare Vermehrung aufweisen und später plötzlich sich intensiv zu vermehren beginnen. Das Gleiche kann man bei einzelnen gelatineverflüssigenden Mikrobenarten beobachten. In der Nährgelatine liegen die Dinge viel günstiger, denn sie enthält gelöstes Pepton und Fleischbrühe. Hier kann sofort auf Kosten dieser diffusiblen Substanzen eine ausgiebige Vermehrung einsetzen. Dieser Anschauung ist die Tatsache keineswegs entgegen, daß Bakterienarten so wie manche Hefe, ihre proteolytischen Enzyme auch nach der Tötung der Zelle erst dann abgeben, wenn sie zertrümmert werden. In der Kultur besorgt diese Zertrümmerung die spontane Autolyse, die ebenfalls enzymatischer Natur ist und in diesem Falle dementsprechend rasch verläuft. Außerdem werden nicht von allen Bakterienarten in gleichem

Maße proteolytische Enzyme erzeugt. Auch der Umstand der regulatorischen Produktion der Enzyme ist zu berücksichtigen, da erwiesenermaßen nur bei der Gegenwart gewisser Stoffe, in unserem Falle von eiweißartigen Stoffen, die Proteasen produziert werden. Ob aber bei letzterer Funktion die nicht diffusiblen Eiweißkörper den Reiz für die Proteasenbildung setzen, erscheint sehr fraglich. Es ist nicht gut einzusehen, wie ein die Zellwand undurchdringlicher Körper, der also nicht in das Zellinnere gelangt, die Bildung der proteolytischen Enzyme anregen soll. Hier scheinen vielmehr jene ersten in die Zelle eindringenden Spaltungsprodukte der Eiweißkörper, die Peptone und Albumosen, das reizende Moment zu sein. Wenn wir noch bedenken, daß dieselben proteolytischen Enzyme auch den reversiblen Prozeß veranlassen, so müssen wir ihnen wieder einen Hauptsitz in den Zellen zuschreiben. Sie werden höchstwahrscheinlich die in die Zellen eingedrungenen Albumosen kondensieren oder koagulieren und auf diese Weise ihren Wiederaustritt unmöglich machen. Die Ausfällung derselben in den Zellen bringt aber gleichzeitig Konzentrationsänderungen mit sich, die ein Nachströmen neuer Pepton- und Albumosenmengen verursachen. Insofern erscheint diese zweite Funktion der Proteasen von großer Wichtigkeit für eine reichliche Nahrungszufuhr zu sein.

Auf alle Fälle darf bei der Deutung der physiologischen Vorgänge in den Bakterienkulturen die Wirkung der toten Zellen nicht außer Acht gelassen werden. Nach den bisherigen Untersuchungen ist die Sekretion der Proteasen durch lebende Bakterienzellen keineswegs erwiesen, da es niemals gelang und auch nur schwierig zu erreichen sein wird, tote Zellen bei diesen Versuchen vollends auszuschalten.

IX.

Kohlenhydrat spaltende Enzyme.

Untersuchungsmethoden. Amylase.

Untersuchungsmethoden.

Wie schon der Name „Kohlenhydrat spaltende Enzyme" ausdrückt, bewirken die in dieser Gruppe vereinten Enzyme eine hydrolytische Spaltung der verschiedenen Kohlenhydrate, die der Säurespaltung analog verläuft. Schon wegen der Wichtigkeit derartiger Spaltungen für den Lebensprozeß finden wir die Kohlenhydrat hydrolysierenden Enzyme bei den Bakterien ungemein weit verbreitet, so daß es schwer hält, eine Aufzählung dieser Bakterienarten vorzunehmen. Die bei verschiedenen Bakterienarten nachgewiesenen und näher untersuchten Enzyme dieser Gruppe sind: Amylase, Cellulase, Gelase, Pektinase, Invertase und endlich Laktase.

Sie alle wirken im weiteren Sinne spezifisch, indem sie nur ein Kohlenhydrat oder eine kleine Gruppe nächst verwandter Vertreter derselben angreifen.

Für den Nachweis dieser Enzyme und ihrer Wirkungsweise dienen alle Methoden, die entweder bestimmte Spaltungsprodukte unmittelbar nachzuweisen gestatten oder mindestens Gruppen derselben summarisch anzeigen. Dabei machen die vielen gleichzeitig vorhandenen Nebenprodukte mehr oder weniger große Schwierigkeiten. Es wurde ja keines der genannten Enzyme in reinem Zustande gewonnen und auf seine Wirkung gegenüber den Kohlenhydraten untersucht. Immer handelt es sich um die Prüfung von desinfizierten Kulturen oder von Kulturfiltraten, die natürlich neben der geringen Enzymmenge noch die verschiedensten Stoffwechselprodukte enthalten. Die üblichen Fällungsmethoden finden zwar auch hier Anwendung, doch die erhaltenen Fällungen sind keine reinen Enzyme. Da diese Enzyme die Spaltungen der Kohlenhydrate im allgemeinen bis zu einfachen Ketosen und Aldosen durchführen, haben wir in der Bildung der wohlcharakterisierten Hydrazone und Osazone ein Mittel in der Hand, die Spaltungsprodukte zu erkennen. Immerhin erfordert aber dieser Weg viel Mühe und Arbeit und fand bei der Untersuchung der bakteriellen Kohlenhydrat spaltenden Enzyme keine gebührende Anwendung. In den meisten Fällen verwendet man die reduzierende Kraft der gebildeten Spaltungsprodukte zur Bestimmung der Enzymwirkung.

Um aber vor falschen Ergebnissen geschützt zu sein, muß stets mit Kontrollproben gearbeitet werden.

Ein weiteres Mittel für die Bestimmung der Enzymwirkungen ist uns durch die optische Aktivität der gebildeten Zerlegungsprodukte in die Hand gegeben. Die Bestimmung des optischen Drehungsvermögens mit den Polarisationsapparaten vor und nach der Enzymeinwirkung gestattet einen Schluß auf die stattgehabten Spaltungsvorgänge. Jedoch dürfen die erhaltenen Ergebnisse auch nur mit Vorsicht verwendet werden. Nicht außer acht gelassen sollen für diese Untersuchungen auch die Bestimmungen mit den übrigen physikalisch-chemischen Methoden werden, die bereits bei der Besprechung der Proteasen erörtert wurden.

Empfindliche, qualitative Reagentien auf eine Reihe von Spaltungsprodukten der enzymatischen Kohlenhydratzerlegung sind gewisse niedere Organismen selbst. So vermögen bestimmte Hefearten nur dann sich zu entwickeln, wenn ganz bestimmte Zuckerarten vorhanden sind, während mit anderen Kohlenhydraten jedes Wachstum unterbleibt. Diese bei Mikroorganismen weitverbreitete auswählende Fähigkeit benützte Beijerinck zur Ausarbeitung der auxanographischen Methode, die für die Untersuchung der qualitativen Verhältnisse der Kohlenhydratspaltung gute Dienste leistet. Als Nährboden für die Versuche verwendet Beijerinck[1]) folgende Gelatine:

Gelatine	100 g	
Monokaliumphosphat . .	0.5 g	
Chlorammonium . . .	0.5 g	(oder Pepton sicc. 10 g oder Asparagin 5 g[2])
Leitungswasser	1000 g	

Zugesetzt wird dann noch 0.5—5 Proz. von dem Kohlenhydrat, das auf seine Spaltung untersucht werden soll und von der verwendeten Hefe nicht unmittelbar assimiliert werden kann (von löslicher Stärke 0.5 Proz., von den Sacchariden bis zu 5 Proz.). Der in Eprouvetten ausgefüllte und verflüssigte Nährboden wird mit der entsprechenden Hefeart bei 32—37$_0$ C vermischt und die eingesäten Zellen durch vorsichtiges Umschwenken gut verteilt. Dann gießt man in sterilisierte Petrischalen aus, die einen gleichmäßig ebenen Boden besitzen und läßt in horizontaler Lage rasch erstarren. Die enzymhaltige Flüssigkeit, die in diesem Falle steril sein muß und kein Desinfektionsmittel enthalten darf, kann man in kleinen Tröpfchen auf die Gelatine bringen oder sie in kleine Stückchen von sterilem Filtrierpapier aufsaugen und diese auflegen. Zur Kontrolle empfiehlt sich die gleichzeitige Verimpfung von vorher aufgekochter enzymhaltiger Flüssigkeit. Wenn nun die auf die Platten gebrachte Enzymlösung ein Enzym enthält, das das in der Platte vorhandene Kohlenhydrat in eine für die verwendete Hefenart assimilierbare Zuckerart spaltet, findet im Umkreis eine Trübung der Gelatine statt, hervorgerufen von den auswachsenden Kolonien der eingeführten Hefe. Die erhitzte Enzymlösung darf kein Wachstum auslösen.

Beijerinck untersuchte eine Reihe von Saccharomyceten und Mycodermen auf ihr auswählendes Verhalten gegen verschiedene Kohlenhydrate.

---

[1]) Beijerinck, Zentralbl. f. Bakt., II. Abt., Bd. 1, 1895.

[2]) Richtet sich nach der verwendeten Hefe, z. B. Pepton oder Asparagin bei Saccharomyces apiculatus, S. fragrans oder S. Kefir. Sonst $ClNH_4$.

In der folgenden Tabelle sind einige Typen nach dem genannten Autor zusammengestellt.

No.	Bezeichnung	Dextrose	Lävulose	Saccharose	Laktose	Maltose	Dextrin
I	Glukosehefen (Saccharomyces apiculatus usw.)	+	+	—	—	—	—
II	Saccharosehefen (Saccharomyces fragrans usw.)	+	+	+	—	—	—
III	Maltosehefen (Saccharomyces cerevisiae, S. ellipsoideus usw.)	+	+	+	—	+	—
IV	Laktosehefen (Saccharomyces Kefir, S. Tyrocola usw.) . .	+	+	+	+	—	—
V	Polysaccharosehefen (Saccharomyces acetaethylicus usw.) .	+	+	+	—	+	+

Das + -Zeichen bedeutet, daß die Hefegruppe das betreffende Kohlenhydrat assimiliert; das — -Zeichen, daß dieses Kohlenhydrat nicht assimilierbar ist.

Für die Auxanographie[1]) eignen sich auch zahlreiche Bakterienarten, die gewisse biologische Eigentümlichkeiten, wie die Bildung von Farbstoffen oder das Leuchten, nur dann sehr gut zeigen, wenn bestimmte Kohlenhydrate im Nährboden anwesend sind. Sie werden also selbst die geringsten Spuren brauchbarer Spaltungsprodukte von ursprünglich unangreifbaren Kohlenhydraten anzeigen, wenn solche durch die Wirkung gewisser Enzyme im Nährsubstrat gebildet werden.

Zu erwähnen ist noch die von Wysmann vielfach angewendete Diffusionsmethode, auf die sich eigentlich die Beijerinck'sche Auxanographie aufbaut. Da hier nicht lebende Organismen das Reagens sind, kann bei dieser Methode mit desinfizierten Enzymlösungen gearbeitet werden. Gelatineplatten werden mit dem zu untersuchenden Kohlenhydrat durchsetzt und mit einem Tröpfchen der Enzymlösung beschickt. Aus dem Tröpfchen diffundiert das Enzym in die Gelatineplatte und bewirkt in dem darin gelösten oder suspendierten Kohlenhydrat die Veränderungen. Wird nachher die Platte mit einem Reagens übergossen, das Farbenreaktionen mit dem ursprünglichen oder mit den entstandenen Produkten auslöst, so treten besonders gefärbte Diffusionsfelder auf. War beispielsweise in der Platte Stärke suspendiert und wurde Amylaselösung aufgetropft, so wird nach einiger Zeit durch aufgegossene Jodlösung die unveränderte Stärke mit Blaufärbung reagieren, die Platte also überall dort, wo keine Veränderung der Stärke statthatte, blau sein, während die Gelatine um den Amylasetropfen farblos bleibt. Bei der Bildung sich anders färbender Spaltungsprodukte werden Mischfarben entstehen, die zonenartig den Ausgangspunkt der Enzymwirkung umgeben.

Bei der Untersuchung der bakteriellen kohlenhydratspaltenden Enzyme können die angeführten Methoden mit geringen Modifikationen mit Vorteil angewendet werden. Außerdem bedient man sich noch gewisser Methoden, die bei der Behandlung der einzelnen Enzyme erörtert werden sollen. Auch sie stützen sich selbstredend auf die bereits angeführten Grundprinzipien des Nachweises der Spaltungsprodukte.

---

[1]) Beijerinck, Arch. Néerlandaises, T. 23.

Amylase.

Unter Amylase[1]) verstehen wir ein im Reich der Lebewesen weitverbreitetes Enzym, das eine hydrolytische Spaltung der Stärke in Maltose und Dextrine unterhält. Man bezeichnet die Amylase auch als Diastase, was aber ein nichtssagender Name ist, der überdies von den Franzosen als Sammelname für sämtliche Enzyme (Fermente) angewendet wird. Von Beijerinck sind unter der Bezeichnung Amylase alle Fermente vereint, die beim Abbau der Stärke bis zu den einfachsten Verbindungen eine Rolle spielen. Um weitere Verwirrungen in der Bezeichnung hintanzuhalten, erscheint es zweckmäßig, die Nomenklatur der Enzyme in der bereits angedeuteten Weise streng durchzuführen, und durch Anhängung der Silbe -ase an den Namen des Ausgangsproduktes oder mindestens an den Stamm dieses Wortes das spezifische Enzym zu bezeichnen.

Die Amylase wirkt auf die verschiedenen Stärkearten sehr verschieden. Im allgemeinen unterliegt der amylolytischen Zersetzung am leichtesten Gersten- und Weizenstärke, während Kartoffelstärke sehr resistent ist. Die rohen Stärkekörner verhalten sich viel widerstandsfähiger als verkleisterte und lösliche Stärke. Dabei spielt die Temperatur, bei welcher die Einwirkung erfolgt, eine wichtige Rolle. Die Zersetzung erfolgt nur in der Weise, daß reduzierende Zucker (Hexobiosen) und amorphe, komplexe Polysaccharide (Dextrin) entstehen, die höchstens geringfügige reduzierende Eigenschaften besitzen und durch Säurehydrolyse in Glukose übergehen.

Dextrin ist ebenfalls kein einheitlicher Körper, sondern besteht aus mehreren Dextrinen, die sich durch verschiedenes Verhalten gegen Jod und mehr oder weniger leichte Fällung durch Alkohol neben anderen Merkmalen auszeichnen:

1. das mit Jod sich rotfärbende Erythrodextrin,
2. das mit Jod sich nicht färbende Achroodextrin,
3. das mit Jod sich purpurn färbende Amylodextrin (Brown und Morris),[2])
4. das Maltodextrin von Brown und Morris.

Alle diese Körper sind in Wasser leicht löslich, kristallisieren nicht und drehen die Polarisationsebene nach rechts. Diese Verbindungen werden von Amylase teils gar nicht angegriffen, teils weiter gespalten.

Nach der von Wysmann, Potevin und Beijerinck vertretenen Anschauung liegen in dem stärkespaltendem Enzym eigentlich 2 Enzyme vor, von denen im allgemeinen das eine eine Lösung der Stärke herbeiführt, während das andere eine Verzuckerung der nun löslichen Stärke bewirkt. Diese vielumstrittene „Zweienzymtheorie" findet in den Ergebnissen der Untersuchungen mit „Reindiastase"[3]) aus Malz von Fränkel und Hamburg eine wesentliche Stütze, da die beiden Forscher für ihr gewiß schon sehr reines Präparat bei der Dialyse gegen gekochtes

---

[1]) Über die Geschichte der Amylase, deren Verbreitung und Eigenschaften siehe Oppenheimer, Die Fermente usw., wo sich auch die überaus zahlreiche einschlägige Literatur findet.

[2]) Brown and Morris. Journ. of the chemic. Soc. London, Vol. 47, 1885 u. Vol. 55. 1889.

[3]) Die Methode der „Reindiastase" wird später auf Seite 81 genau erörtert.

Brunnenwasser beobachteten, daß die Membran vornehmlich die verzuckernden Diastasen rasch passieren, während die stärkelösenden Enzyme quantitativ zurückgehalten wurden.

Nach den schon genannten Untersuchungen über die Amylase (Diastase) von Fränkel und Hamburg ist dieses Enzym gegen chemische Einflüsse äußerst empfindlich. Selbst Lösung der Fränkel-Hamburg'schen Reindiastase in destilliertem Wasser bewirkt schon Abnahme der Wirkung. Noch viel schädlicher sind die Wirkungen des Alkohols, der in kurzer Zeit dieselbe zerstört. Ebenso wirken Azeton und Äther. Auch gegen hochgespannte Säure erwies sich dieselbe sehr wenig widerstandsfähig.

In dieser sehr wirksamen Reindiastase haben wir eine Substanz vor uns, die selbst nicht die geringsten reduzierenden Eigenschaften besitzt und keine Eiweißreaktionen mehr gibt. Die Lösung derselben scheint nach den von Fränkel und Hamburg angegebenen ultramikroskopischen Befunden kolloidaler Natur zu sein. Bei der Betrachtung von Reindiastaselösungen im Ultramikroskop kommt ausschließlich das bikonkave Lichtbündel zur Beobachtung, womit bewiesen ist, daß sich in der Lösung sehr kleine Systeme finden, die selbst das Ultramikroskop nicht mehr aufzulösen vermag. Damit ist das Durchgehen derselben durch Tonzellen bei der Filtration unter Druck und das Ausbleiben der elektrosmotischen Wanderung durch Tonzellen völlig erklärt. Die Verhältnisse bei der Dialyse sprechen noch für eine unterschiedliche Größe der Diastasemoleküle.

Mit zunehmender Verunreinigung der Amylase durch die normal anwesenden und nur schwierig trennbaren Stoffe nimmt deren Resistenz gegen schädigende äußere Faktoren zu. Im allgemeinen wirken die Salze der Schwermetalle (Quecksilberchlorid, Zink-, Eisen-, Bleisalze usw.) sehr stark schädigend. Außerdem schädigen die Amylase eine Reihe von Giften, wie Atropin usw. Über die hemmenden Einflüsse der gebildeten Stoffwechselprodukte gehen die Meinungen der Untersucher etwas auseinander, indem man von einigen Seiten denselben keine schädigende Wirkung zuschreibt, während z. B. Müller-Thurgau ihnen besonders bei höheren Temperaturen einen störenden Einfuß auf den Gang der Stärkespaltung zuspricht.

Die verschiedenen Teile des Spektrums weißen Lichtes wirken verschieden intensiv schädigend auf die Amylasen. Nach den Untersuchungen von Green[1]) äußern besonders die ultravioletten Strahlen eine deletäre Wirkung, während die grünen Strahlen weniger schädigend wirken. Im Rot, Orange und Blau des Spektrums findet die Zerstörung der Amylasen erst sehr spät statt, nachdem zuvor eine Förderung der amylolytischen Wirkung beobachtet wird. Diese erklärt man damit, daß durch die letztgenannten Strahlen das Zymogen der Amylase in das wirksame Enzym übergeht, das in der Folge der Vernichtung anheimfällt.

Nach Sigmund schädigt das Ozon die Amylase beträchtlich, wenn durch Durchleiten desselben die enzymhaltige Flüssigkeit damit gesättigt wird.

Die Wirkung der Amylase wird durch Temperaturen über 70° C rasch geschwächt und aufgehoben, wobei eine Zerstörung des Enzymes eintritt.

---

[1]) Green, Philosoph. Transact. of the Royal Soc., Ser. B., Vol. 188, 1897.

Die verschiedenen Temperaturen haben auf die Stärke der Wirkung einen wesentlichen Einfluß. Kjeldahl[1]) bestimmte die Wirkung der Amylase eines Malzaufgusses auf Stärkekleister bei verschiedenen Temperaturen aus der reduzierenden Kraft der Abbauprodukte und erhielt dabei interessante Aufschlüsse über den Einfluß der einzelnen Temperaturen. Aus diesen Untersuchungen geht hervor, daß die optimale Wirkung bei ungefähr 63° C eintritt; von da fällt die Wirkung rasch ab und wird über 70° gleich Null.

Bei 0° ist die Amylase unwirksam.

Die Wirkung der Amylase wird durch eine Reihe äußerer Faktoren bis zu einem gewissen Grade gefördert. So fand Effront, daß die Amylasespaltung durch Aluminiumacetat, Vanadinsalze, anwesende Phosphate, Pikrinsäure, Asparagin, besonders Amidosäuren[2]) uud Eiweißstoffe in passenden Mengen begünstigt wird. Nach Kjeldahl[3]) bewirken geringe Mengen von Milch-, Butter- und Essigsäure ebenfalls eine Förderung der Wirkung.

Übereinstimmend mit Detmer fand Müller-Thurgau, daß die Kohlensäure die amylolytische Spaltung der Stärke wesentlich begünstigt,[4]) besonders bei gleichzeitig erhöhtem Druck. Unter diesen Verhältnissen wird auch rohe Stärke heftig angegriffen.

Die Amylase scheint in ihrer Wirkung der Schütz'schen Regel zu folgen, die ausdrückt, daß die Spaltungsgeschwindigkeit der Quadratwurzel aus der Enzymmenge proportional ist.

Die Spaltung geht bis zur Herstellung eines Gleichgewichtszustandes weiter, erstreckt sich aber nicht auf die gesamte Stärke. Wird durch neuerliche Stärkezugabe das Gleichgewicht gestört, so setzt der Spaltungsvorgang wieder ein. Die Wiedererweckung der Spaltung durch neue Stärkedosen läßt sich aber keineswegs ins Unbegrenzte wiederholen, denn schon nach dem zweiten Zusatz findet eine beträchtliche Abnahme der Amylasewirkung statt, die schließlich gänzlich unwirksam wird. Es tritt eine Schädigung des Enzymes ein.

Auch für die Diastasen oder Amylasen erhielt man durch Immunisierung spezifisch wirksame Antiamylasen (Antidiastasen) wie u. a. auch aus den Versuchen von Preti zu entnehmen ist.

Wie schon im allgemeinen über die kohlenhydratspaltenden Enzyme berichtet wurde, gelang die Gewinnung einer reinen Amylase noch nicht. Wie die proteolytischen Enzyme, so wird auch die Amylase durch Fällungsmittel mit anderen Stoffen vereint niedergeschlagen. Sie ist in verdünntem Alkohol (bis 20 Proz.) löslich und kann damit entsprechend dem Lintner'schen Verfahren aus Malz ausgezogen und durch weiteren Zusatz von starkem Alkohol gefällt werden. Der erhaltene, mit absolutem Alkohol auf dem Filter gewaschene Niederschlag kann durch Wiederauflösen und Wiederfällen gereinigt und in wässriger Lösung durch Dialyse auf einen sehr niedrigen Salzgehalt gebracht werden. Dieses Reinigungsverfahren hat aber seine Grenze, da mit steigender Reinheit auch die amylolytische Kraft nachläßt. Es wurden noch andere Methoden be-

---

[1]) Kjeldahl, zitiert nach Effront-Bücheler, Leipzig 1900, S. 118.

[2]) Effront, Allg. Brauer- und Hopfenztg. Jahrg. 45, 1905.

[3]) Kjeldahl, Zeitschr. f. d. gesamte Brauw. 1880.

[4]) Vgl. dazu auch Mohr, Zeitschr. f. Spiritusindustrie, Bd. 25 u. Baswitz, Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch., Bd. 11 u. 12.

nutzt, um Malzamylase darzustellen, so die Fällung mit basisch-essigsaurem Blei, das dann als Schwefelblei nach Durchleiten von Schwefelwasserstoff entfernt wird.

Besonders beachtenswert ist die erst kürzlich von Fränkel und Hamburg versuchte Reindarstellung, die die beiden Untersucher auch auf die Darstellung von Bakterienenzymen auszudehnen versprachen. Das ganze Verfahren zerfällt in drei Teile. Der erste Teil besteht in einer chemischen Reinigung von den nicht enzymatischen Stoffen, der zweite Teil in einer mechanischen Reinigung und Sterilisierung durch Filtration und endlich der dritte aus der biologischen Hauptreinigung. Für die Malzamylase arbeiteten Fränkel und Hamburg folgende Methode aus: Malzschrot wird mit der dreifachen Gewichtsmenge Wasser bei 25° C eingemaischt und nach einstündigem Umrühren nach einer weiteren halben Stunde koliert und der Rückstand abgepreßt. Die Kolatur wird in der Kälte sedimentieren gelassen und abgepreßt. Nach Bestimmung der amylolytischen Kraft in Bezug auf Verflüssigung und Verzuckerung in der Flüssigkeit, wird solange basisch-essigsaures Blei zugefügt, als die diastatische Kraft unverändert bleibt. Das klare Probefiltrat darf keine Fällung mit Schwefelammon geben. Man läßt dann absitzen, filtriert durch Papier und saugt hierauf das gesamte Filtrat durch ein Pukalfilter in sterile Flaschen, in denen die Flüssigkeit einer Gärung mit Frohberghefe bei 28° C unterworfen wird. Die Hefe soll schon früher an zuckerarme Nährböden gewöhnt sein. Nach Beendigung dieser Gärung passiert die Flüssigkeit abermals ein Pukalfilter und wird in sterilen Gefäßen bei 10 mm Hg-druck auf ungefähr $^1/_{20}$ des Volumens eingeengt. Wurde die Flüssigkeit sauer, wird sie mit sterilisiertem kohlensauren Kalk neutralisiert. Jetzt wird das eingeengte Filtrat einer neuerlichen Gärung mit einem Gemisch von Frohberg- und Logoshefe unterworfen. Dieses Hefengemisch wird durch die Zucht in stickstoffarmen Nährsubstraten möglichst stickstoffhungrig gemacht. Nach Eintritt des genau festzustellenden Endvergärungsgrades wird die Flüssigkeit durch ein Pukalfilter steril filtriert und im Vakuum soweit eingeengt, daß eine sirupartige Substanz übrig bleibt. Durch weiteres Einengen im Vakuum über Schwefelsäure kann ein trockenes, gebliches Pulver erhalten werden, das sich nach seiner Wiederauflösung in Wasser als sehr kräftig amylolytisch erweist.

Die von Effront für andere Zwecke angewendete Methode der biologischen Trennung von Substanzen verspricht für die Darstellung der Enzyme sehr gute Erfolge und kann auch für die Gewinnung der Bakterienenzyme Verwendung finden, besonders in Verbindung mit dem Buchner-Hahn'schen Preßverfahren.

Es wurden für die Darstellung von amylolytisch wirksamen Niederschlägen aus Malzinfusen noch einige andere Methoden benutzt, die aber vor den geschilderten keine Vorzüge besitzen.

Wie schon die Amylasen der höheren Pflanzen unter sich nicht vollständig identisch sind, so ist nicht zu erwarten, daß die aus Bakterien gewonnenen amylolytischen Enzyme mit ersteren ohne weiteres zu identifizieren sind. In den Grundeigenschaften decken sie sich aber doch mit der Malzamylase.

Bevor noch mit rein gezüchteten Bakterienarten im großen Stile gearbeitet wurde, ahnte man doch schon bei diesen Mikroorganismen die Anwesenheit und Tätigkeit sehr wirksamer Enzyme, die auch Stärke

energisch angreifen. So schreibt Nägeli in seinem Werke „Über die niederen Pilze“: „Ein besonderes energisches Ferment wird von den Spaltpilzen abgesondert. Dasselbe führt den Milchzucker in gärungsfähigen Zucker über, setzt Stärke und Cellulose (Holz) in Traubenzucker um, löst geronnenes Eiweiß und andere Albuminate.“ Die folgenden Untersuchungen brachten viele Bestätigungen dafür, wenn es sich auch herausstellte, daß für die einzelnen Wirkungen verschiedene Enzyme verantwortlich sind. Wortmann machte Beobachtungen, die ihn zur Vermutung brachten, daß auch feste Stärkekörner durch Bakterien angegriffen werden. Diese Vermutung wurde zur Tatsache durch experimentelle Versuche mit den in faulenden Bohnen- und Kartoffelinfusen anwesenden Bakterien. Diese Bakterienarten, nach Wortmann vornehmlich Bacterium Termo, wirken nun auf die verschiedenen Stärkearten unterschiedlich energisch ein und nur dann, wenn jede andere Kohlenstoffquelle mangelt. Wortmann erbrachte mit Alkoholfällungen aus diesen Infusen den Nachweis von der Existenz eines Enzymes, das die Stärkespaltungen bewirkt und von den Zellen abgesondert werden soll.

Brunton und Mac Fayden konnten Amylase in Kulturen des Klein'schen Schorfbazillus und Welford-Bazillus nachweisen, wenn diese Mikroben auf Stärkekleister gezüchtet wurden. Dieses Enzym sollte dagegen fehlen, wenn die genannten Bakterienarten in Nährmedien mit Fleischextrakt kultiviert wurden.

Fermi[1]) züchtete eine Reihe von Bakterienarten in Blutserum, desinfizierte dann diese Kulturen mit Thymolwasser und prüfte mit Stärkekleister auf amylolytische Enzyme. Diese Versuche ergaben, daß die Käsespirillen, der Vibrio Finkler-Prior und Vibrio cholerae auch bei der Zucht in Blutserum Amylase bilden, während unter gleichen Bedingungen vom Bacillus prodigiosus und Bacillus pyocyaneus dieses Enzym nicht produziert wurde.

Fermi untersuchte noch eine Reihe von verschiedenen Mikroorganismen, die mehr oder weniger stark ein amylolytisches Enzym bildeten. Besonders die Streptothrixarten produzieren es sehr lebhaft. Alle untersuchten Mikroben konnten es aber nur in eiweißhaltigen Nährsubstraten erzeugen.

Gottheil konnte für mehrere Erdbakterien die Amylasebildung bei der Zucht in verschiedenen Nährsubstraten dadurch nachweisen, daß er in zwei Proberöhrchen zirka je 8 cm^3 der Kulturflüssigkeit brachte, in welcher die betreffende Bakterienart durch ungefähr vier Wochen gewachsen war, die eine Probe durch Aufkochen amylasefrei machte und beide Röhrchen unter Chloroform-, bezw. Toluolzusatz mit 4 cm^3 einer Stärkelösung von 0,25 g Stärke in 500 g Wasser versetzte. Nach 24 Stunden wurden einige Tropfen einer Jodjodkaliumlösung (1 g Jod + 1 g Jodkalium + 400 g Wasser) zugesetzt und aus dem Unterschiede der Blaufärbung in den beiden Proben auf die Amylasebildung geschlossen. Diese Methode ist natürlich sehr ungenau und gestattet nur den Nachweis stärkerer Amylasewirkungen. Mittels dieser Methode wies Gottheil für folgende Bakterienarten in den angegebenen Nährlösungen starke Amylaseproduktion nach:

Bacillus ruminatus A. M. et Gottheil nach vierwöchentlichem

---

[1]) Fermi, Arch. f. Hygiene, Bd. 10, 1890. Zentralbl. f. Bakt., I. Abt., Bd. 12, 1892.

Wachstum bei 28° C in den Nährlösungen mit 1 g Pepton, 1 g Liebigs Fleischextrakt, 1 g Rohrzucker in 100 g Wasser oder 1 g Asparagin, 1 g Glyzerin, 0,5 g Rohrzucker in 100 ccm mineralischer Nährlösung[1]).

Bacillus graveolens A. M. et Gottheil in der Nährlösung mit 1 g Asparagin und 3 g Rohrzucker in 100 ccm mineralischer Lösung.

Bacillus petasites A. M. et Gottheil in der Nährlösung mit 1 g Asparagin und 3 g Galaktose in 100 ccm mineralischer Lösung.

Bacillus subtilis Cohn in den Nährlösungen mit 1 g Pepton, 1 g Liebigs Fleischextrakt, 1 g Rohrzucker in 100 ccm Wasser oder 1 g Asparagin und 3 g Dextrose in 100 ccm mineralischer Lösung.

Schwache Amylasebildung wurde festgestellt bei:

Bacillus tumescens Zopf in den für Bacillus ruminatus oben angegebenen Nährsubstraten.

Aus dem Mitgeteilten geht hervor, daß im allgemeinen die Bildung der Amylase bei den Bakterien nicht an die Anwesenheit bestimmter Stoffe im Nährboden gebunden ist. Die Menge des erzeugten Enzymes scheint aber doch mit der Darreichung von Stärke im Kulturmedium vermehrt zu werden. Katz untersuchte unter Pfeffers Leitung die Diastasebildung in Kulturen des Bacillus megatherium und kommt ebenfalls mit Fermi zum Schluß, daß die Anwesenheit von Stärke in der Kultur für die Bildung von Amylase nicht unbedingt nötig ist. Vielmehr sind jene Produkte für die Amylasebildung störend, welche bei der Stärkespaltung entstehen. Aus diesen Gründen hemmen einige Zucker sofort die Amylaseproduktion, während andere keinen Einfluß zeigen. Immerhin machen darin doch einige Bakterien eine Ausnahme. Schon Fermi konnte zeigen, daß Bacillus prodigiosus, ein typischer Kleisterbewohner, in Blutserum gezüchtet keine Amylase bildet und dennoch bei seinem Wachstum auf Stärkekleister amylolytische Vorgänge auslöst.

Wie schon die Pfeffer'schen Untersuchungen dartun, ist die Bildung von Amylase ein vom Organismus regulatorisch beeinflußter Vorgang, der eine gewisse Grenze erreicht. Nach Katz wird der Grenzwert für die Amylasebildung durch einen direkten Einfluß des Protoplasma mit bestimmt. Außerdem sorgt die ständige Abfuhr der angehäuften Amylasemengen für eine ausgiebigere Bildung derselben.

Gerade diese Befunde sprechen allerdings dafür, daß die Amylase von den Bakterienzellen ausgesondert wird. Die Frage nach der Sekretion dieses Enzymes scheint vom Standpunkte der Zweckmäßigkeit zwar rasch gelöst, doch ist dabei zu berücksichtigen, daß keineswegs alle Zellvorgänge und die daraus sich ergebenden Stoffwechselprodukte immer für die betreffende Zelle von Nutzen sein müssen. Aus diesem Grunde liegt auch die Notwendigkeit nicht vor, daß dieses Enzym unbedingt während des Lebens die Zelle verläßt. Die Kulturversuche sind hier nicht ohne weiteres ausschlaggebend, da auch hier die Rolle der bereits toten Zellen nicht außer Acht gelassen werden darf. Die von Van Senus und Eijkman[2]) angewendete Diffusionsmethode zum Nachweis von diastatischen Wirkungen kann nach diesen Überlegungen

[1]) Die mineralische Nährlösung hatte folgende Zusammensetzung: Kaliumphosphat (wahrscheinlich Monokaliumphosphat) 1 g, Calciumchlorid 0,1 g, Magnesiumsulfat 0,3 g, Natriumchlorid 0,1 g in 1000 ccm Wasser mit einer Spur Eisen.

[2]) Eijkman, Zentralbl. f. Bakt., I. Abt., Bd. 29, 1901.

die Sekretionsfrage nicht entscheiden. Wohl aber ist sie geeignet, die amylolytische Wirksamkeit und die Bildung einer in die Stärkeagarplatte diffundierenden Amylase nachzuweisen. Der endgültige Beweis für die Sekretion kann nur dadurch erbracht werden, daß junge Kulturen in flüssigen Nährsubstraten filtriert und die restierenden Zellen mit neuer indifferenter Nährlösung gewaschen werden. Die nach dem Buchner-Hahn'schen Preßverfahren davon hergestellten Preßsäfte dürfen entweder keine oder nur sehr geringe amylolytische Wirkung äußern im Vergleich zu den Kulturfiltraten, sofern eine Sekretion dieses Enzymes statthat. Dieser Versuch ist leider nicht gemacht, weshalb der experimentelle Beweis für die Sekretion der Amylase noch nicht vollständig erbracht erscheint.

Die von Wood gemachte Annahme, daß die Verzuckerung des Stärkekleisters durch den Vibrio cholerae unmittelbar auf eine Wirkung seines Protoplasmas zurückzuführen sei, ist unbedingt zurückzuweisen, da zwischen dem Plasma der lebenden Vibrionen und der gequollenen Stärke kein unmittelbarer Kontakt bestehen kann.

Die Amylase der verschiedenen Bakterien zeigt bei den verschiedenen Temperaturen eine unterschiedliche Wirkung. Fermi hat daraufhin die amylolytischen Enzyme einzelner Bakterienarten untersucht und erhielt folgende Ergebnisse: Die Amylase des Bacillus anthracis wirkt bei +4° C noch nicht, während bei 37 und 50° C durch sie aus Kleister sehr viel reduzierende Substanz gebildet wird. Bei 70° C äußert sie keine Wirkung mehr. Etwas anders verhält sich die Amylase der Käsespirillen. Sie spaltet Stärkekleister bereits bei + 4° C, erreicht ihre maximale Wirkung um 37° C und erweist sich bei 50° C nur mehr schwach wirksam. Auch sie wird bei 70° C zerstört. Ungefähr gleich verhält sich die Amylase des Vibrio Finkler-Prior. Eine Ausnahme macht das amylolytische Enzym des Choleravibrio insofern, als seine Zerstörungstemperatur bei 60° C liegt.

Die durch Alkoholfällungen aus Kulturen erhaltenen amylolytisch wirksamen Pulver ertragen eine bedeutend höhere Erhitzung als das gelöste Enzym. So soll eine kürzere Einwirkung der Temperatur von 120—140° C die Amylase in trockenem Zustande nicht schädigen. Sicherlich schützen die mitgefällten Stoffe das Enzym vor der Hitzeeinwirkung, da die Fränkel-Hamburg'sche Reindiastase doch eine äußerst empfindliche Substanz ist.

Der Gang der bakteriellen Amylasespaltung von Stärke läßt sich nur sehr schwierig verfolgen, da ja die gebildeten Spaltungsprodukte sofort weiter aufgearbeitet werden. Einiges Licht in diese Vorgänge bringen die Untersuchungen von Villiers. Darnach vermag ein Bacillus amylobacter allerdings Stärke in Dextrin überzuführen, letzteres bleibt aber unangegriffen. Andererseits wissen wir aber, daß es Bakterien gibt, die nicht Stärke, wohl aber Dextrin zu spalten vermögen. Hierher gehört der von Grimbert und Ficquet untersuchte Bacillus tartricus, der außer einer Reihe anderer Kohlenhydrate auch Dextrin spaltet, nicht aber Stärke. Ähnlich verhält sich auch der Friedländer'sche Pneumoniebazillus. Außerdem vermögen die meisten stärkespaltenden Mikroorganismen die Zerlegung sehr tief weiter zu führen, wobei es natürlich schwierig zu entscheiden ist, wieweit die reine Amylasewirkung reicht.

Die früher schon erwähnte Zweienzymtheorie erhält durch diese Befunde an den Bakterien eine nicht unwesentliche Stütze, indem man

auch für die Bakterienamylasen eine Zusammensetzung aus zwei Enzymen annehmen kann, von denen das eine die Stärke hydrolysiert und die Amylase im engeren Sinne des Wortes vorstellt, während das andere die entstandenen Dextrine weiter abbaut und als Dextrinase für sich zu behandeln ist. Diese Anschauung dürfte der Wirklichkeit am nächsten kommen.

Einen Aufschluß über die weite Verbreitung der Amylase bei den Bakterien geben die Untersuchungen von Eijkman. Zum Nachweis dieses Enzymes bediente sich der genannte Forscher der bereits kurz erwähnten Stärkeagarplatten, die er durch Mischen von Amylum oryzae oder Amylum maranthae in gequollenem Zustande mit Nähragar herstellte. Die zu Platten verarbeitete Agarstärkeemulsion zeigte in der Umgebung derjenigen Kolonien eine Aufhellung, die durch amylolytisch wirksame Bakterienarten gebildet wurden. Er kultivierte eine große Anzahl von pathogenen und saprophytischen Bakterienarten auf diesen Stärkeagarplatten bei Brüttemperatur. Ein 4—6 mm breiter Aufhellungskreis entstand nach 24 Stunden bei der Zucht folgender pathogenen Bakterienarten:

Bacillus anthracis, bei dem schon Mamus und Fermi Amylase nachwiesen.

Vibrio cholerae, dessen amylolytische Wirkung schon von zahlreichen Untersuchern festgestellt wurde (Gordon u. a.).

Vibrio Metschnikovi und endlich ein für Meerschweinchen pathogener und dem Choleravibrio ähnlicher Wasservibrio.

Eine geringere Aufhellung, also eine schwächere Amylasebildung zeigten der Bacillus diphtheriae und Bacillus dysenteriae Kruse. Eine nur spurweise Produktion von amylolytischem Enzym wurde beobachtet bei Bacterium pestis, dann bei einigen Stämmen des Bacillus typhi und Bacterium coli.

Van Senus stellte nach dem gleichen Verfahren die Bildung von Amylase bei Clostridium butyricum fest.

Stärke wird gespalten vom Bacillus amylozyme Perdrix, vom Granulobacter butyricum Beijerinck, vom Amylobacter butylicus nach der Angabe von Duclaux[1]).

Schattenfroh und Grassberger geben die Produktion von amylolytischem Enzym für bewegliche Buttersäurebakterien und Granulabacter saccharobutyricum an.

Besonders kräftig amylolytisch wirksame Mikroben fanden sich nach den Untersuchungen von Marcano und Cavazzani auf Getreidekörnern. Hierher gehört der Bacillus maydis und der mit ihm vielleicht identische aber jedenfalls nahe verwandte Bacillus tritici.

Gran wies bei Meeresbakterien, wie Bacillus trivialis und Bacillus gelaticus v. energica sehr starke Amylasebildung nach.

Mit dieser gedrängten Aufzählung sind aber die bekannt gewordenen amylolytisch wirkenden Bakterienarten noch lange nicht erschöpft. Doch ist daraus zumindest zu entnehmen, daß die Amylase im Reiche der Bakterien weit verbreitet ist.

---

[1]) Duclaux, Annales de l'Inst. Pasteur, T. 9, 1896.

X.

Fortsetzung der Kohlenhydrat spaltenden Enzyme.

Cellulase. Pektinase. Gelase. Invertase. Laktase.

Cellulase.

Die Zersetzung der Cellulose durch Bakterien wurde in ihren Einzelheiten eigentlich erst vor verhältnismäßig kurzer Zeit durch die Untersuchungen von Omelianski[1]) bekannt. Ist schon der Begriff „Cellulose" ein weiter, unter dem eine Reihe von Kohlenhydraten von sehr verschiedener Resistenz gegen Hydrolysen und Oxydationen vereint sind, so gingen über die Gärung oder besser gesagt über die Spaltung dieser Körper die Ansichten noch weiter auseinander. Die verschiedensten Bakterien wurden für diese Spaltungen verantwortlich gemacht. Es spielt ja auch die Cellulosespaltung in der Natur eine wichtige Rolle, insonderheit für den Kreislauf des Kohlenstoffes. Tatsache ist es, daß zahlreiche Vertreter der Bakterienflora des Mistes die Fähigkeit besitzen, Cellulose zu lösen und weiterer Zersetzung zugänglich zu machen. Die im Schlamm der offenen Gewässer angesammelten Pflanzenreste werden ebenfalls unter Gasbildung in einfachste Verbindungen zerlegt, wobei eine Menge von Cellulose der Zersetzung anheimfällt. Omelianski unterzog die Zersetzung der Cellulose einem eingehenden Studium und kommt dabei er zur Annahme von zwei Typen von Zersetzungen, der Wasserstoff- und Methangärung, die auch durch zwei verschiedene Bakterienarten verursacht werden.

Die Wasserstoffgärung der Cellulose ergibt als gasförmige Endprodukte Kohlensäure und Wasserstoff.

Die Bilanz dieser Zersetzung der Cellulose ergibt nach Omelianski folgende Verhältnisse für einen größeren Versuch mit schwedischem Filterpapier.

---

[1]) In Lafars Handbuch der technischen Mykologie, Bd. 3, Kap. 9: „Die Cellulosegärung", behandelt von W. Omelianski, findet sich die gesamte frühere Literatur mustergültig zusammengestellt. Auch sind dort die Einzelheiten über die Wasserstoff- und Methangärung der Cellulose nachzusehen Die Spezialarbeiten auf diesem Gebiete von Omelianski finden sich in der Literaturzusammenstellung dieses Buches.

Zum Versuch verwendete Cellulose	3.4743 g
Davon verblieben unzersetzt	0.1272 „
Daraus berechnete Menge zersetzter Cellulose . . .	3.3471 „

Bei der Zersetzung gebildete Fettsäuren . .	2.2402 g
„ „ „ „ Kohlensäure .	0.9722 „
„ „ „ „ Wasserstoff . .	0.0138 „
Summe der Zersetzungsprodukte	3.2262 g

Die Methangärung der Zellulose liefert als gasförmige Zersetzungsprodukte neben viel Kohlensäure Methan.

Nach Omelianski zeigt sich für einen Versuch mit schwedischem Filtrierpapier folgende Bilanz:

Zum Versuch verwendete Cellulose	2.0815 g
Davon verblieben unzersetzt	0.0750 „
Daraus ergibt sich für die Menge zersetzter Cellulose	2.0065 „

Bei der Zersetzung gebildete Fettsäuren. .	1.0223 g
„ „ „ „ Kohlensäure .	0.8678 „
„ „ „ „ Methan . . .	0.1372 „
Summe der Zersetzungsprodukte	2.0273 g

Die von Omelianski isolierten Cellulose zersetzenden Bakterien sind strenge Anaërobier. Durch die Untersuchungen von van Herson wurden in Gemischen auch aërob wachsende Mikroben bekannt, die sehr rasch und energisch die verschiedenen Cellulosepräparate, wie Leinfasern, Baumwolle u. dgl. zerstören. Eine nicht sporenbildende aërobe Bakterienart, Bacillus ferrugineus van Iterson, zersetzt ebenfalls Papier besonders in Gegenwart eines gelben Mikrokokkus, der an der eigentlichen Cellulosezersetzung selbst unbeteiligt ist. Übrigens wurden schon frühzeitig von Nägeli und De Bary Bakterienarten genannt, die das Vermögen der Auflösung von Cellulose besitzen sollen.

Für die Erreger der Cellulosezersetzung ist es auffallend, daß sie sich unmittelbar auf dem zu lösenden Substrat ansiedeln und daß entsprechend den mikroskopischen Befunden nur in nächster Nähe derselben die Lösung des Kohlenhydrates erfolgt. Es ist demnach die Annahme eines nur in sehr geringem Grade ausgeschiedenen und wahrscheinlich sehr unbeständigen Enzymes gerechtfertigt, das bei höheren Pflanzen auch tatsächlich nachgewiesen wurde. Man bezeichnet es am zweckmäßigsten als Cellulase und nicht als Cytase, eine Benennung, die eigentlich nur für zelllösende Enzyme gerechtfertigt ist.

Über die Gewinnung der Cellulase aus Substraten, in denen Cellulosezersetzung platzgegriffen hat, wird von van Senus berichtet. Dem genannten Forscher gelang es durch die übliche Fällung mit Alkohol im Überschuß aus der Flüssigkeit, in der faulende Rüben zerrieben wurden, eine Fällung zu erhalten, die in Wasser gelöst celluloselösende Eigenschaften besaß. Unter Choroformzusatz wurde die Cellulose aus Bohnenschnitten teils vollständig gelöst, teils energisch angegriffen.

Pektinase.

Die Pektinkörper der Pflanzenreste unterliegen ebenfalls einer bakteriellen Zersetzung, die durch eine Reihe von Mikroorganismen her-

vorgerufen wird. Praktischen Gebrauch macht man davon in großem Maßstabe bei der Gewinnung der Gespinstfasern, wobei die Isolierung der Faser durch die sogenannte Rotte oder Röste[1]) erzielt wird. Bei der Rotte sind nun eine Anzahl von Bakterien beteiligt, die Pektinkörper in lösliche und weiter vergärbare Stoffe zersetzen. Für die hydrolytische Spaltung der Pektinsubstanzen nimmt man spezifische Enzyme an, die von den betreffenden Bakterien ausgeschieden werden. Bourquelot und Hérissey vereinigten diese Enzyme in der Gruppe der Pektinasen, deren Wirkung unter Ausschaltung der sie erzeugenden Bakterien noch nicht näher untersucht ist.

Jones untersuchte den Bacillus carotovorus, den Erreger der Weichfäule von Mohrrüben, auf seine Enzyme. Darnach bildet derselbe ein Enzym, das an Mohrrüben die Erscheinungen der typischen Weichfäule hervorrief. Erhitzen auf 62° C durch 10 Minuten zerstört es. Formaldehyd schädigt es sehr, weniger Thymol und Chloroform, am geringsten eine 0.5 proz. Phenollösung. Durch Fällung von Bouillonkulturen des in Rede stehenden Bacillus mit 95 proz. Alkohol und Trocknung des erhaltenen Niederschlages im warmen Luftstrom von 40° C konnte Jones ein enzymreiches Pulver gewinnen, das in Wasser gelöst die charakteristischen Erscheinungen der Weichfäule hervorrief. Jones bezeichnet dieses Enzym als Pektinase.

Hierher gehört auch die Pektosinase, das Enzym des von Beijerinck und van Delden als Erreger der technischen Flachsrotte isolierten Granulobacter pectinovorum. Dieses Bakterium soll mittels der von ihm ausgeschiedenen Pektosinase die Pektose des Flachses hydrolytisch spalten und die dabei entstehenden einfachen Zuckerarten weiter vergären. Besondere Versuche mit dem aus Kulturen abgeschiedenen Enzym liegen nicht vor, die unter Anwendung des Buchner-Hahn'schen Preßverfahrens vielleicht sehr interessante Ergebnisse hätten.

Gelase.

Gran[2]) machte bei der Zucht von Meeresbakterien auf Agar die Beobachtung, daß unter den Kolonien und in ihrer Umgebung der Agar erweicht wurde und deutliche Einsenkungen aufwies. Durch die Einwirkung dieser Bakterien verlor dieses Kohlenhydrat die Eigenschaft, sich mit Jodkaliumlösung dunkelviolett, bezw. in wenig konzentrierter Lösung rotviolett zu färben. Gran beschreibt eine Bakterienart, Bacillus gelaticus n. sp. Gran, die durch zwei Varietäten, v. genuina und v. energica, vertreten wird und die Fähigkeit besitzt, Agar zu erweichen, bezw. zu lösen. Der Prozeß scheint eine hydrolytische Spaltung zu sein, wobei reduzierende Spaltungsprodukte entstehen, die sehr rasch weiter zersetzt werden. Die reduzierenden Substanzen konnte der genannte Forscher in der Weise nachweisen, daß er diese Bakterien mit Agarplatten untersuchte, die einen Gehalt von 3 Proz. Natriumchlorid, 0.1 Proz. Dikaliumphosphat und 0.1 Proz. Chlorammonium hatten. Auf diese Agarplatten brachte er einen

[1]) Näheres darüber bei Behrens, Die Pektingärung, wo sich die Literatur über dieses Gebiet findet. (Lafars Handbuch der technischen Mykologie, Bd. 3, Kapitel 10.)

[2]) Gran, Bergens Museums Aarbog 1902, Heft 1.

Tropfen einer Kultur von Bacillus gelaticus v. energica, in einiger Entfernung davon einen Tropfen derselben Kultur, aber mit Chloroform getötet und endlich noch einen Tropfen einer Kultur von einer anderen Bakterienart, Bacillus trivialis. Nach zwei Tagen waren im ersteren und letzteren Falle die Bakterien zu Auflagerungen ausgewachsen, die chloroformierte Probe blieb steril. Nun übergoß Gran die Platte mit Fehling'scher Lösung und erwärmte schwach. Um die Kolonie des Bacillus gelaticus und um den chloroformierten Kulturtropfen desselben zeigten sich große, rotgelbe Reduktionsfelder, während um die Auflagerung des Bacillus trivialis davon nichts zu bemerken war.

Mittels der Auxanographie von Beijerinck konnte die Bildung von Spaltungsprodukten aus Agar durch die genannte Bakterienart ebenfalls festgestellt werden. Zu dem Ende benützte Gran einen Nähragar, der 1.5 Proz. Agar, 3 Proz. Kochsalz, 1 Proz. Pepton, 0.1 Proz. Monokaliumphosphat enthielt, eine schwach alkalische Reaktion aufwies und mit Lakmus schwach gefärbt war. Hierin wurde Bacillus phosphorescens Beijerinck gleichmäßig verimpft und darnach der Agar zu Platten verarbeitet. Nachdem in einigen Tagen die Bakterien ihr maximales Leuchtvermögen aufwiesen, wurden darauf Impfstriche mit Bacillus gelaticus v. genuina, Bacillus gelaticus v. energica und Bacillus trivialis Gran angelegt. Auf der nach 3 Tagen im allgemeinen nur mehr schlecht leuchtenden Platte zeigten sich um die Impfstriche der ersten, ganz besonders stark aber um den Kulturstreifen der zweiten Bakterienart leuchtende Felder, während um den Impfstrich des Bacillus trivialis die Platte dunkel blieb. Die erstgenannten Bakterien haben den Agar hydrolytisch in Spaltungsprodukte zerlegt, die das Leuchtvermögen des Bacillus phosphorescens erhöhten, wie dies eine Reihe von einfachen Zuckern bewirkt.

Wie der Versuch mit abgetötetem Kulturmateriale zeigt, ist die Agarhydrolyse auf ein diffusibles Enzym zurückzuführen. Dieses Enzym wird durch Kochen zerstört, denn erhitzte Kulturen haben das Agarlösungsvermögen verloren. Entsprechend dem Körper, gegen den dieses Enzym seine Tätigkeit richtet, benennt es Gran **Gelase.** Dies ist allerdings eine Abkürzung, da dem den Agar vornehmlich zusammensetzenden Kohlenhydrat „Gelose" eigentlich ein Enzym „Gelosease" zukommen soll.

Gran entscheidet die Frage nach einer Identifizierung der Gelase mit der Amylase dahin, daß Amylase und Gelase verschiedene Enzyme sind. Er stützt diese Annahme auf folgende Versuchsergebnisse. Der lebende und mit Chloroform getötete Bacillus gelaticus v. genuina wirkt auf Stärke kaum merkbar ein, dafür stark auf Agar. Bacillus trivialis greift nur Stärke an, während von ihm Agar, bezw. Gelose, nicht hydrolysiert wird. Bacillus gelaticus, v. energica erweicht sowohl lebend als auch mit Chloroform getötet sehr intensiv Agar und löst energisch Stärke. Für die Verschiedenheit der Gelase und Amylase spricht auch die verschieden rasche Diffusion beider Enzyme in der Agargallerte.

In anderen Bakterien wurde die Gelase bisher nicht nachgewiesen.

Invertase.

Die in der Natur weitverbreitete Invertase (Invertin, Sukrase, Citocymase, Ferment der Glukose) spaltet unter Wasseraufnahme Rohrzucker nach der Gleichung

$$C_{12}H_{22}O_{11} + H_2O = C_6H_{12}O_6 + C_6H_{12}O_6$$

in 1 Molekül Dextrose und 1 Molekül Lävulose.

Sie kann in verunreinigtem Zustande aus Hefen nach verschiedenen Fällungsverfahren[1]) dargestellt werden und ist ein sehr empfindliches Enzym. Dasselbe wird durch kurz andauernde Erhitzung auf 70° C zerstört, wenn es sich in wässriger Lösung befindet. Dabei ist zu bemerken, daß das gärfähige Kohlenhydrat der Invertase einen gewissen Schutz gewährt. Gegen Hitzewirkung verhält sich die in den Zellen befindliche Invertase wesentlich anders als in Freiheit gesetzte, denn nach den Angaben von Bau[2]) behält eine auf 105° erhitzte, getrocknete Hefe ihre invertierende Eigenschaft über 5 Jahre.

Durch sehr geringe Säuremengen[3]) wird die Invertase in ihrer Wirkung gefördert. Ein höherer Säure- oder Alkaligehalt setzt die Wirksamkeit sehr beträchtlich herab. Dabei ist aber ein gewisses Verhältnis zwischen zugesetzter Säuremenge zu beobachten, da durch Zugabe neuer Invertasemengen die Säurewirkung herabgemindert werden kann.

Die Invertase wird noch durch eine Reihe äußerer Faktoren erheblich beeinflußt. Über die schädigende Wirkung von Quecksilbersalzen und blausauren Salzen gehen die Meinungen etwas auseinander, was seinen Grund wohl darin hat, daß die verschieden hergestellten und verschieden verunreinigten Invertasen der einzelnen Autoren sich gegen die genannten Verbindungen auch verschieden verhalten werden. Die Konzentration der Invertasen und das Lösungsmittel werden dabei gewiß ebenfalls eine Rolle spielen. Alkohol schädigt im allgemeinen die Invertase. Nach O'Sullivan und Tompson wird dieses Enzym bei einem Alkoholgehalt von 47 Proz. quantitativ gefällt und geht bei 28 Proz. Alkoholgehalt gerade noch in Lösung. Aber schon wenige Prozente Alkoholgehalt hindern es in seiner Wirkung. Die üblichen Antiseptika beeinflussen es sehr verschieden, entsprechend der Konzentration und dem Vorhandensein von fremden Beimengungen und spaltbarem Zucker.

Wie Mereshkowsky genauer untersuchte, wirken Anilinfarben auf die Invertase schädigend ein. So behindert Fuchsin in einer Verdünnung von 1:1000 die Invertasewirkung beträchtlich und macht dieses Enzym mitunter vollständig unwirksam. Kongorot und Safranin wirken kaum ein. Es scheint also die Wirkung dieser Farbstoffe von ihrer Molekularstruktur abhängig zu sein. Ob die vom genannten Autor angenommene lockere Bindung zwischen Farbstoff und Enzym zu Recht besteht, muß vorderhand dahingestellt bleiben.

---

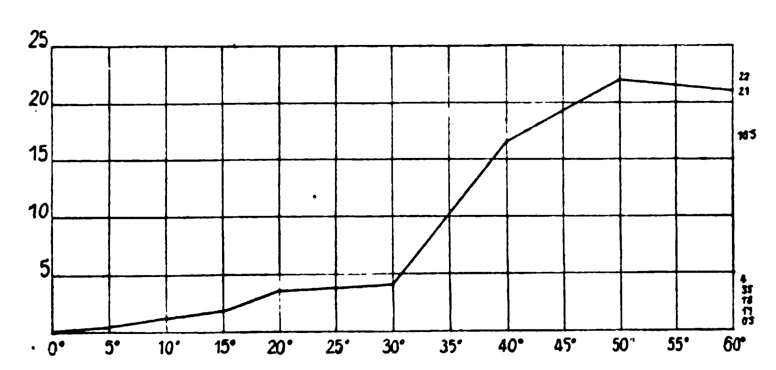
[1]) Vgl. Oppenheimer, Die Fermente, II. Aufl., S. 250 u. f., wo die einschlägige Literatur sich findet. Außerdem Green-Windisch, Die Enzyme, und Effront-Bücheler, Diastasen, I. Bd. Hier befindet sich ebenfalls die ältere Literatur über Invertase breit dargestellt.

[2]) Bau, Wochenschr. f. Brauereien, Bd. 20, 1903.

[3]) Vgl. Fernbach, Paris 1890.

Das Sonnenlicht beeinflußt die Invertase sehr verschieden. Am stärksten wird sie geschädigt, wenn die Lösung derselben sauer ist und in Berührung mit Luft der Belichtung ausgesetzt wird, während bei alkalischer Reaktion der Lösung die Schädigung sehr gering ist. Wird die Bestrahlung der Invertinlösung unter Ausschluß des Luftsauerstoffes vorgenommen, dann wirkt das Licht überhaupt nicht ein (Jodlbauer). Nach Jodlbauer schützen selbst bei Sauerstoffanwesenheit gegen die Lichtwirkung der Rohrzucker und die ganze Gruppe der Hexosen. Bei diesen Versuchen kann es sich nur um die Wirkung der sichtbaren Strahlen handeln, da die Untersuchung in Glasgefäßen vorgenommen wurde. Wesentlich anders liegen die Verhältnisse bei der Verwendung von Quarzgefäßen, die ultraviolette Strahlen bekanntlich durchlassen. Über das Invertin liegen diesbezügliche Versuche von Jodlbauer und Tappeiner vor, aus denen hervorgeht, daß die ultravioletten Strahlen besonders zerstörend auf Invertin in der Sauerstoffatmosphäre wirken, etwas weniger intensiv in Wasserstoff, Stickstoff und Kohlensäure, selbst wenn Sauerstoff absorbierende Mittel für vollständiges Fehlen dieses Gases sorgten.

Auf die Wirkung der Invertase hat die Temperatur einen wesentlichen Einfluß, einerlei, ob Sauerstoff vorhanden ist oder nicht (Jodlbauer). Nach den Angaben von Effront[1]) erzeugt Hefeinvertase in 20 proz. Rohrzuckerlösung nach einstündiger Einwirkung bei verschiedenen Temperaturen folgende Mengen Invertzucker: 0° C 0, 5° C 0.05, 10° C 0.11, 15° C 0.18, 20° C 0.35, 30° C 0.4, 40° C 1.65, 50° C 2.2, 60° C 2.1. Wenn man die angegebenen Grade auf die Ordinate und die gebildeten Mengen Invertzucker auf die Abszisse aufträgt und die Marken verbindet, erhält man eine graphische Darstellung des Verlaufes, die eine gute Übersicht gewährt.

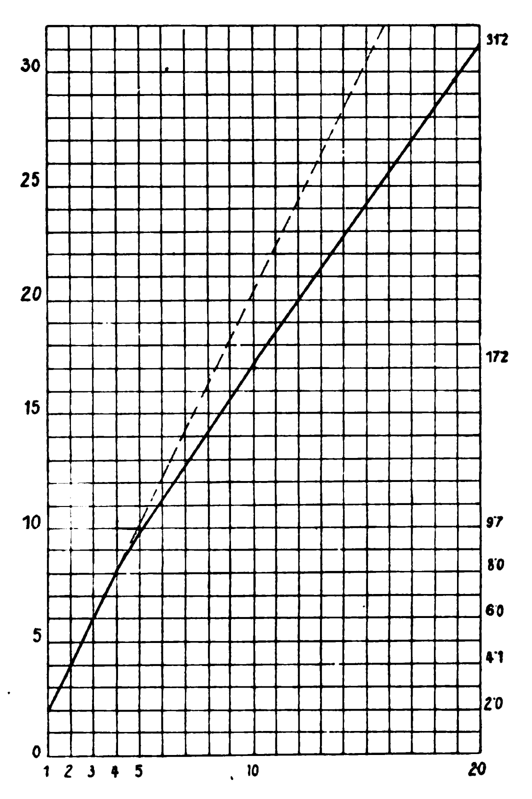


Die obenstehende Kurve wurde nach diesen Gesichtspunkten konstruiert. Aus ihrem Verlauf ist ohne weiteres ersichtlich, daß mit zunehmender Temperatur die Wirkung bis 15° allmählich ansteigt und dann einen kleinen Sprung macht, um zwischen 20 und 30° sich wieder langsam zu erhöhen. Von 30° ab steigt die Wirkung rapid und erreicht bei 50° ihren Höhepunkt. Dann fällt sie bis 60° langsam ab. Für Invertasen anderer Herkunft würden sich andere Kurven ergeben, da die Tem-

[1]) Effront-Bücheler, Die Diastasen, S. 62.

peraturoptima verschieden liegen. So wurden für die Invertase untergäriger und obergäriger Hefen Unterschiede in der günstigsten Temperatur für die Wirkung bekannt.

Nach den Untersuchungen von Duclaux ist die Invertase ein äußerst wirksames Enzym, das bis zu der 4000fachen Menge seines eigenen Gewichtes an Rohrzucker zu spalten vermag. Immerhin verläuft der Prozeß auch beim Temperaturoptimum verhältnismäßig langsam. Nach Effront bildet bei 50° C in 10proz. Rohrzuckerlösung 1 cm^3 Invertase nach 1 Std. 0.20, 2 Std. 0.41, 3 Std. 0.60, 4 Std. 0.80, 5 Std. 0.97, 10 Std. 1.72, 20 Std. 3.12 Invertzucker. Über den Einfluß der Zeit orientiert am besten die nebenstehende nach den oben erörterten Gesichtspunkten angelegte Kurve, deren Abzisse die Zeitmarken trägt. Aus dem Verlauf der vollausgezogenen Linie ist zu entnehmen, daß bis zur vierten Stunde eine unmittelbare Proportionalität zwischen Wirkungsdauer und erzeugter Invertzuckermenge besteht. Dieses Verhältnis bleibt annähernd auch noch in der fünften Stunde erhalten. Dann tritt aber eine zunehmende Verzögerung ein. Die gestrichelte Linie gibt den Verlauf an, wenn die anfangs herrschende Proportionalität dauernd vorhanden wäre.



Die Verzögerung beginnt dann, wenn ungefähr 20 Prozent des vorhandenen Rohrzuckers gespalten sind und nimmt mit steigender Zunahme des Invertzuckers ebenfalls zu.

Nach den Untersuchungen von Henri[1]) unterliegt die Geschwindigkeit der Invertasewirkung komplizierteren Gesetzen, auf die hier nicht weiter eingegangen werden kann, aus denen der genannte Autor aber den Schluß zieht, daß bei der Invertasewirkung intermediäre Verbindungen zwischen Enzym und Spaltungsprodukten gebildet werden. Darnach sind in der invertierenden Zuckerlösung jederzeit gebundene und freie Invertasemengen vorhanden.

Über die chemische Natur der Invertase geben die vorliegenden Untersuchungen keine einheitlichen Resultate. Man hat zwar durch Anwendung verfeinerter Methoden festgestellt, daß die früheren Invertasepräparate durch gummiartige Kohlenhydrate wesentlich verunreinigt

[1]) Henri, Lois générales des diastases. Paris 1903.

wären, doch gelang eine vollständige Ausschaltung derselben auch heute noch nicht, wie die Arbeiten von Salkowski, Oshima, Wroblewsky u. a. ergaben. Die von Osborne, Kölle und Salkowski[1]) u. a. dargestellte Invertase gab keine Eiweißreaktionen mehr, doch ergaben die Elementaranalysen immer Stickstoff. Nach Donath, Barth, O'Sullivan[2]) ergibt die Elementaranalyse einer möglichst rein dargestellten Invertase C 40.5—46.4, H 6.6—8.4, N 3.6—9.4. Friedenthal und Miyamota konnten ein Präparat der Invertase erhalten, dessen Wirkung nach Abtrennung der Nukleinsäurekomponente und Eiweißkomponente vollständig erhalten blieb. Nach Dialysierversuchen erwies sich dieses Präparat dennoch als eine kompliziert molekular gebaute Verbindung. Soviel kann demnach als sichergestellt gelten, daß die Invertase kein Eiweißkörper ist. Nach den Untersuchungen von Osborne nähert sich die Zusammensetzung der Invertase derjenigen von Chitin.

Die Invertase findet sich bei den Bakterien weit verbreitet. Es ist ja eine bekannte Tatsache, daß Rohrzucker einer überaus großen Anzahl der verschiedensten Bakterienarten als zugängliche Kohlenstoffquelle dienen kann. Wenn auch nicht in allen diesen Fällen ein direkter Nachweis der Invertase geschah, so sind wir doch berechtigt, bei der Rohrzuckerspaltung dieses Enzym als vorhanden anzunehmen, da es zumindest sehr unwahrscheinlich ist, diese Spaltung in einzelnen Fällen auf eine unmittelbare Protoplasmatätigkeit zurückzuführen.

Eingehende Untersuchungen über die Bakterieninvertase haben uns Fermi und Montesano[3]) geliefert, nachdem von zahlreichen Forschern die invertierende Eigenschaft gewisser Mikroorganismen bereits festgestellt worden war. So konnte Fermi bei Bacillus megatherium und Bacillus kiliensis jederzeit invertierende Wirkungen beobachten. Nach van Tieghem invertiert der Froschlaichbazillus, Leuconostoc mesenteroides. Weiter invertieren nach Vignal Bacillus mesentericus vulgatus, nach Grimbert Bacillus orthobutylicus, nach Grimbert und Ficquet Bacillus tartricus. Nach Heinze Bacillus megatherium. Sclavo wies für Choleravibrionen und Vibrio Metschnikovi invertierende Eigenschaften nach, auf deren Inkonstanz Fermi und Montesano aufmerksam machen. Ward und Green berichten über ein Zuckerbakterium mit invertierenden Eigenschaften. Auch für Pneumoniebazillen, Bacillus subtilis, Sauerteigbazillen (Peters) und für peptonisierende Milchbakterien (Kalischer) liegen Angaben über invertierende Eigenschaften dieser Mikroben vor. Levy und Pfersdorff wiesen in mit Chloroform getöteten und getrockneten Prodigiosusbakterien Invertase nach. Damit ist die Reihe der Saccharose spaltenden Bakterienarten noch keineswegs erschöpft.[4])

Einige Invertase erzeugende Bakterien behalten dieses Vermögen unter verschiedenen Umständen bei. So lehren uns die Untersuchungen

---

[1]) Salkowski, Zeitschr. f. physiolog. Chemie, Bd. 31, 1900.
[2]) Zitiert nach Cannon, Country Brewers Gazette 1903.
[3]) Fermi u. Montesano, Zentralbl. f. Bakt. II. Abt., Bd. 1, 1895.
[4]) Auch die meisten der bei den verschiedenen „Schleimgärungen“ bekannt gewordenen Mikroorganismen vermögen Rohrzucker zu spalten und als Kohlenstoffquelle zu verwerten, was ebenfalls auf Invertasebildung zurückzuführen ist. Darüber näheres in Lafars Technischer Mykologie, Bd. I, 1897.

von Fermi und Montesano, daß Bacillus megatherium und Bacillus kiliensis sowohl in saurer, als auch in neutraler und stark alkalischer Bouillon Invertase erzeugen und Inversion herbeiführen. Andere Bakterienarten verhalten sich in dieser Beziehung verschieden. Bacillus fluorescens liquefaciens und Proteus vulgaris vermögen allerdings in saurer, neutraler und leicht alkalischer Nährbouillon zu invertieren, nicht aber in stark alkalischer Bouillon, trotzdem auch hier ausgezeichnetes Wachstum statthat.

Um den Einfluß des Rohrzuckers auf die Bildung der Bakterieninvertase festzustellen, züchteten Fermi und Montesano u. a. Mikroben auch Bacillus megatherium, Bacillus kiliensis, Bacillus fluorescens liquefaciens und Proteus vulgaris in Peptonbouillon ohne Rohrzucker, aber mit hohem Glyzeringehalt und vermischten dann die Kulturen zu gleichen Teilen mit 10proz. Rohrzuckerlösung und einer 2proz. Karbolsäurelösung. Nach einiger Zeit wurde mit der Reaktion von Nylander und Rubner-Penzoldt auf reduzierenden Zucker untersucht. Sämtliche angeführten Bakterienarten produzierten ungehindert Invertase, trotz Abwesenheit von Rohrzucker in den Kulturen. Wurde aber jeder Zusatz von Kohlenhydrat vermieden, dann erzeugte nur mehr Bacillus megatherium Invertase, und dies geschah nicht immer. Die Enzymproduktion hängt im allgemeinen mit der Anwesenheit von Eiweißkörpern nicht zusammen, denn auch auf eiweißfreien Nährsubstraten tritt Invertasebildung auf, sofern Rohrzucker oder Glyzerin als Kohlenstoffquelle zur Verfügung steht (Fermi und Montesano). Für diese Versuche verwendeten die genannten Autoren eine auffallend konzentrierte Nährsalzlösung, enthaltend 0.5 g weinsaures Ammon, 0.5 g phosphorsaures Kalium, 0.5 g Magnesiumsulfat, 0.05 g Kalziumphosphat, 5 g Rohrzucker oder Glyzerin in 100 ccm destilliertem Wasser.

Die Bakterieninvertase ist gegen Säuren anscheinend empfindlich, denn schon die für Enzyme sonst relativ unschädliche Karbolsäure zerstört sie innerhalb kürzerer Zeit. Aus diesem Grunde muß für den Nachweis dieses Enzymes beim Gebrauch der Karbolsäure als Desinfiziens große Vorsicht walten und ein negativer Befund darf nicht ohne weiteres auf mangelnde Enzymbildung geschoben werden. Wie wir in der allgemeinen Besprechung der Hefeinvertase gehört haben, ist sie gegen Säuren bedeutend widerstandsfähiger.

Auch gegen Erwärmen erweist sich die Bakterieninvertase als wenig widerstandsfähig. Schon eine zweistündige Einwirkung von 50° C auf die Glyzerinbouillonkultur von Bacillus fluorescens liquefaciens und Bacillus kiliensis vernichtet ihre Inversionskraft. Etwas resistenter erweist sich die Invertase in Glyzerinbouillon von Bacillus megatherium und Proteus vulgaris, da sie erst durch eine einstündige Erwärmung auf 55° C ihrer Wirkung beraubt wird. Die in Kulturfiltraten befindliche Invertase ist noch empfindlicher. Einen Schutz gegen die Wärmewirkung gewährt die gleichzeitige Anwesenheit von Rohrzucker, da in diesem Falle die Tötungstemperatur höher liegt.

Die Bakterieninvertase von Bacillus megatherium und Bacillus kiliensis passiert bei der Dialyse Pergament nicht.

Bei der Filtration von alten Kulturen der genannten Bakterienarten geht der größte Teil der Invertase durch das Porzellanfilter hindurch.

Wie die Filtrate von Kulturen auf eiweißfreien und eiweißhaltigen Nährsubstraten ergeben, findet ein Übergang des Enzymes in die Flüssigkeit vornehmlich im zweiten Fall statt. Die Filtrate von Kulturen in eiweißfreien Nährlösungen erweisen sich als sehr gering oder überhaupt nicht wirksam.

Schon diese Erfahrung legt die Frage nahe, in welchem Maße überhaupt eine Sekretion des Enzymes durch die lebende Zelle statthat. Die bisher über Bakterieninvertase vorliegenden Untersuchungen vermögen diese Frage nicht zu beantworten. Einen Fingerzeig geben uns allerdings die Befunde an Hyphomyceten, von denen Arten bekannt wurden, die Invertase überhaupt nicht abgeben und doch kräftig invertieren. Ja noch mehr, selbst aus toten Hyphen konnte das Enzym nicht mit Wasser ausgezogen werden. Auch die von Vandevelde[1]) mit Invertase ausgeführten Versuche zur Bestimmung der Durchgängigkeit dieses Enzymes durch Cellulosemembranen unter Zuhilfenahme der Leune'schen Cellulosehülsen sprechen gegen eine Sekretion der Invertase, denn sie wirkte nur innerhalb der Membran auf die Saccharoselösung, welche ungehindert diffundierte wie der Invertzucker. Wir können demnach mit einiger Vorsicht den Standpunkt einnehmen, daß die Invertase von den lebenden Bakterienzellen wahrscheinlich nicht sezerniert wird, sondern intrazellulär wirkt und daß die im Kultursubstrat durch Filtration nachweisbare, geringe Invertasemenge aus den abgestorbenen Zellen ausgetreten ist. Für diese Annahme spricht auch die Tatsache, daß Filtrate von jungen invertierenden Kulturen keine Invertase enthalten. Dem widerspricht der Befund keineswegs, daß in jungen Kulturen kein Invertzucker nachweisbar ist, da bei intrazellulär vorhandener geringer Invertasemenge die Rohrzuckerspaltung nur in geringem Grade durchgeführt wird und die weitere Zerlegung des entstandenen reduzierenden Zuckers rasch eintritt, so daß es zu einer Ansammlung von intermediären Produkten gar nicht kommt.

Die experimentelle Entscheidung dieser Frage kann nur durch die Anwendung der Buchner-Hahn'schen Preßmethode auf junge, invertierende Bakterienkulturen, besonders auf Kulturrasen, herbeigeführt werden. Derartige Versuche wurden aber bisher nicht gemacht.

Laktase.

Unter Laktase verstehen wir ein spezifisch auf Milchzucker (Laktose) wirkendes Enzym. Durch dasselbe wird Laktose in d-Glukose und d-Galaktose gespalten. Diese Spaltung ist analog mit der Hydrolyse durch Mineralsäuren in der Hitze, wobei aber die Umwandlung nur sehr schwierig und langsam vor sich geht.

Von Beijerinck[2]) wurde Laktase mittels der Auxanographie (siehe Seite 76) unter Verwendung von Photobakterien bei Saccharomyces Tyrocola nachgewiesen. Emil Fischer[3]) konnte auf Grund der durch Glukosazonbildung nachgewiesenen Glukose die Laktasewirkung bestätigen. Die Laktase wird größtenteils in den leben-

[1]) Vandevelde, Biochem. Zeitschr., Bd. 1, 1906.
[2]) Beijerinck, Zentralbl. f. Bakt., I. Abt., Bd. 6, 1889.
[3]) Fischer, Emil, Berichte d. Deutsch. chem. Gesellsch., Bd. 27, 1894.

den Zellen zurückgehalten, weshalb Kulturfiltrate sehr häufig keine Milchzucker invertierenden Eigenschaften besitzen. Durch Verreiben der Zellen mit Quarzsand und darauffolgende Wasserextraktion gelingt es dagegen, wirksame Filtrate zu erhalten. Nach Fischer und Frankland-Armstrong bewirkt Laktase bei 35° C in konzentrierten Lösungen von Glukose und Galaktose eine Rückbildung von Laktose oder einem letzterer ähnlichen Disaccharid (Isolaktose). Hier haben wir wieder ein Beispiel für die Reversibilität der Enzymwirkung.

Die Laktase äußerst ihre kräftigste Wirkung bei Temperaturen um 39° C. Über die hemmenden oder fördernden Einflüsse der verschiedenen Antiseptika und anderen chemischen Agentien wissen wir so gut wie nichts. Uberhaupt bedarf die ganze Laktasefrage bei den Bakterien einer gründlichen Bearbeitung, denn jetzt können wir nur aus einigen Befunden mit lebenden Bakterienzellen Schlüsse auf die Natur und Wirkungsweise dieses bei den Bakterien keineswegs so selten vorkommenden Enzymes ziehen.

Schütze[1]) gelang es, durch Injektionen von Kefirlaktase unter die Haut von Kaninchen oder in den Brustmuskel des Huhnes im Blutserum des betreffenden Tieres eine Substanz zu erhalten, die dieses Enzym in der Spaltung von Milchzucker sehr stark hemmte oder hinderte. Diese Antilaktase verlor selbst nach zweistündiger Erwärmung auf 60° C ihre Wirkung nicht. Im normalen Blutserum vom Kaninchen oder Huhn konnte keine Antilaktase nachgewiesen werden.

Laktase dürfen wir bei jenen Bakterien voraussetzen, die im Stande sind, Laktose zu spalten, da ja dieses Disaccharid nicht an und für sich einer unmittelbaren tieferen Spaltung zugänglich zu sein scheint. Es wurde eine Reihe von Mikroben bekannt, die unter Bildung von Alkoholen und Milchsäure den Milchzucker zerlegen. In diesen Fällen wird durch eine Laktase die Inversion der Laktose bewirkt und die Spaltungsprodukte dann einer alkoholischen oder Milchsäuregärung unterworfen. Zu mindest für die alkoholische Gärung müssen wir eine Bildung von Dextrose aus Laktose voraussetzen. Es wurden nun Bakterien bekannt, die in der Tat Laktose unter Alkoholbildung vergären, wie z. B. Bacillus acidi laevolactici Schardinger, der Laktose im wesentlichen unter Bildung von Linksmilchsäure, Kohlensäure und Alkohol spaltet. Bei alleiniger Darreichung von Glukose als spaltbare Substanz erscheinen dieselben Spaltungsprodukte. Es erscheint demnach der Schluß gerechtfertigt, daß die Laktose zuerst in Galaktose und Glukose durch eine Laktase hydrolytisch gespalten und in der Folge die Glukose weiter vergoren wird, da über eine Spaltung der Galaktose für diesen Bazillus keine Angaben vorliegen. Bacterium coli zersetzt Milchzucker und dessen invertierte Produkte. Auch hier scheint die Wirkung einer Laktase vorhanden zu sein. In allen ähnlichen Fällen dürfte es sich nicht um eine direkte Vergärung des Milchzuckers handeln, vielmehr um eine Reihe von Prozessen, die nach einander ablaufen. Aus dem Mißlingen des Nachweises von den durch Laktase intermediär gebildeten Spaltungsprodukten kann aus dem Grunde noch kein Schluß auf den Mangel der Bildung derselben gezogen werden, da sie ja den verschiedenen Kohlenhydratgärungen verhältnismäßig leicht zugängliche Substanzen

---

[1]) Schütze, A., Zeitschr. f. Hyg., Bd. 48, 1904.

sind. Ein endgültiges Urteil wird sich übrigens erst dann darüber fällen lassen, wenn zellenfreie Laktaseversuche mit Bakterien vorliegen werden.

Es ist eine bekannte Tatsache, daß zahlreiche Bakterienarten auch noch eine Reihe anderer Kohlenhydrate als Kohlenstoffquellen durch Spaltung ausnutzen können. Bei den Pilzen, höheren Pflanzen und auch Tieren konnten noch kohlenhydratspaltende Enzyme nachgewiesen werden, deren Wirkung wir auch bei einzelnen Spaltpilzen zu beobachten Gelegenheit haben. So gibt es Bakterien, die Maltose verarbeiten und dies höchstwahrscheinlich mit einem Enzym, der Maltase, vollführen. Auch über Trehalose spaltende Bakterien wird berichtet, die dieses Disaccharid wahrscheinlich mit einem besonderen Enzym, der Trehalase, in zwei Moleküle Glukose spalten. Auch Raffinose oder Melitriose soll einer bakteriellen Spaltung zugänglich sein, ausgeführt durch die Raffinase. Alle letztgenannten Enzyme, sofern wir sie bei den Bakterien annehmen wollen, nachdem zu deren Ablehnung kein Grund vorliegt, wurden bisher noch nicht im losgetrennten Zustand zellenfrei untersucht. Deshalb können sie hier keine nähere Behandlung erfahren.

XI.

Glukosid spaltende Enzyme.

Emulsin.

Fett spaltende Enzyme.

Lipase.

Oxydasen.

Tyrosinase. Essigsäurebakterienoxydase.

Reduzierende Enzyme.

Reduktasen.

Emulsin.

Sowohl viele natürliche Glukoside als auch die α-Modifikationen der künstlichen Glukoside (Emil Fischer) werden wenigstens von Hefeenzymen durch Hydrolyse in ihre Komponenten gespalten, während von ihnen die β-Glukoside unangegriffen bleiben. Die letzteren, denen eine Reihe natürlicher Glukoside gleichkommt, unterliegen wieder einer Spaltung durch „Emulsin“ (Synaptase) oder „Emulsin ähnliche Enzyme“. Von den letztgenannten Glukosiden wird nur ein einziges durch Hefeenzym angegriffen, nämlich das Amygdalin, wobei aber keine eigentliche Zerlegung erfolgt, sondern nur die Abspaltung von einem Molekül Dextrose. Die Trennung führen die Hefeinvertase und Hefemaltase herbei. Ob nun bei den Bakterien ähnliche Verhältnisse wie bei der Hefe vorliegen, ist nach den bisher vorliegenden Untersuchungen schwer zu entscheiden. In einigen Fällen scheint übrigens bei Bakterien ein dem „Emulsin“ höchst nahestehendes oder vielleicht identisches Glukosid spaltendes Enzym vorzukommen, während in anderen Fällen auch an Enzyme des Maltasetypus in Bezug auf Glukoside zu denken ist.

Wie schon einleitend bemerkt, spaltet das Emulsin [1]) „Amygdalin“

---

[1]) Näheres bei Oppenheimer, Die Fermente und ihre Wirkungen, wo sich auch die Literatur über die Chemie der Glukosidspaltungen findet.

in Benzaldehyd, Blausäure und Dextrose entsprechend der Gleichung:

$$C_{20}H_{27}NO_{11} + 2\,H_2O = C_7H_6O + HCN + 2\,(C_6H_{12}O_6)$$

Durch das Emulsin werden noch andere Glukoside hydrolytisch gespalten, wie Salizin, Arbutin, Helizin, Phloridzin u. a., aus denen unter andern ein Molekül Traubenzucker entsteht. Außerdem wird durch das Emulsin der bei der Amygdalinspaltung durch Hefeenzym entstandene Rest, Mandelnitrilglukosid in Benzaldehyd, Blausäure und Traubenzucker zerlegt.

Nach Tamman liegt das Optimum der Emulsinwirkung bei 40—45° C. In Lösung wird dieses Enzym schon bei 70° C oder wenig darüber zerstört. In getrocknetem Zustande ist es sehr hitzebeständig, denn selbst eine mehrstündige Erhitzung auf 100° vernichtet es nicht.

Auf das Emulsin wirken Alkalien besonders schädlich ein, während Mineralsäuren[1]) es in der Wirkung behindern. Organische Säuren, wie Essigsäure oder Ameisensäure äußern keinen Einfluß, wie schon Bouchardat im Jahre 1845 nachwies.

Protoplasmagifte, wie Chloroform, Äther, Thymol, dann Toluol usw. zeigen für Emulsin keine schädigenden Einwirkungen. Ebenso verhalten sich die meisten Schwermetallsalze und Neutralsalze, denn von den untersuchten Verbindungen verzögern die Emulsinwirkung nur schwefelsaures Kupfer und kohlensaures Ammoniak.

Das Emulsin folgt im allgemeinen den Wirkungsgesetzen der Invertase; ebenso gilt das in Bezug auf letzteres Enzym über den Einfluß der Konzentration und der gebildeten Spaltungsprodukte Mitgeteilte für das Emulsin.

Eine Reindarstellung von Emulsin gelang bisher nicht. Marino und Sericano haben zwar durch Pressung von Mandelfutterkuchen bei 150—200 Atmosphären Druck einen Preßsaft erhalten, aus dem sie durch Alkohol einen Emulsinhaltigen Niederschlag erhielten, den sie über Schwefelsäure trockneten. Diesen lösten sie in mit Ammoniak versetzter Chlorammoniumlösung und machten nach 12stündigem Stehenlassen die Lösung durch Dialyse salzfrei. Dann fällten sie abermals mit Alkohol und wiederholten diese Fällungen mit dem wiedergelösten Niederschlag fünfmal. Durch diese Reinigung fiel der Aschengehalt auf 2,2 Proz. Die Elementaranalyse eines derartig bereiteten Emulsins ergab

C 43.68
H 7.62
N 13.64

Wenn man diese Zahlen mit denen der Elementaranalyse von der Invertase (Seite 93) vergleicht, so findet man, daß in beiden Fällen das Verhältnis zwischen Kohlenstoff und Wasserstoff gleich ist.

Wie die Untersuchungen von Gérard[2]), Bourquelot[3]), Puriewitsch[4]) u. a. ergaben, findet sich das Emulsin bei den Holz be-

[1]) Jacobson, Zeitschr. f. physiolog. Chemie, Bd. 16. 1892.
[2]) Gérard, E., Compt rend. de la soc. de biologie, Paris 1893.
[3]) Bourquelot, Compt. rend. de la soc. de biologie, Paris, 1893, S. 653 u. 804, Compt. rend. Acad. Paris, T. 117, 1893.
[4]) Puriewitsch, K., Berichte d. Deutsch. bot. Gesellsch., Bd. 16, 1898.

wohnenden Pilzen und bei Schimmelpilzen häufig. Gérard erhielt durch Alkoholfällung bei Penicillium glaucum ein Emulsinhaltiges Fermentgemisch, das auf Amygdalin und Salizin spaltend wirkte.

Auch bei Bakterien beobachtete man die Fähigkeit, Glukoside zu spalten, wie aus den darüber von Fermi und Montesano[1]) angestellten Versuchen zu entnehmen ist, die zum Teil unter Ausschaltung der lebenden Zellen ausgeführt sind.

Die beiden Forscher wiesen bei wenigen Bakterien Amygdalin spaltende Eigenschaften nach und züchteten gerade diese Mikroben im Großen in Nährbouillon mit und ohne Glyzerin. Dann stellten sie nach 15- und 30tägigem Wachstum mit Porzellanfiltern Filtrate her, die sie mit einer 2proz. Karbolsäure oder 0.04proz. Quecksilberchlorid enthaltenden Amygdalinlösung zu gleichen Teilen mischten. In allen Fällen konnte kein Emulsin nachgewiesen werden.

In einem einzigen Fall, in dem das Kulturfiltrat des Micrococcus pyogenes tenuis zur Anwendung kam, gelang es, den ausgeprägten Benzaldehydgeruch wahrzunehmen und mit Nylanders Reagens reduzierenden Zucker nachzuweisen, nachdem die genannten Untersucher von einer Filtration absahen. Um die lebenden Zellen auszuschalten, benutzten sie in diesem Falle eine 5tägige Bouillonkultur des bezeichneten Mikrokokkus, die mit Karbolsäure desinfiziert war. Die anderen Amygdalin spaltenden Mikroben versagten aber vollständig und bewirkten bei analogen Versuchen nicht die geringste Spaltung, einerlei, nach welcher Züchtungszeit sie geprüft wurden. Daraus ziehen Fermi und Montesano nun den Schluß, daß die bei ihren Mikroben in lebenden Kulturen mit Amygdalin auftretenden Spaltungen eine Folge der unmittelbaren Protoplasmatätigkeit seien. Dieser Ansicht können wir uns nach der von Buchner und seinen Mitarbeitern an anderen Mikroorganismen gemachten Erfahrungen nicht anschließen, da die Versuche von Fermi und Montesano keineswegs die Anwesenheit eines sehr fest am Plasma hängenden Emulsins ausschließen. Die schon so oft genannte Buchner-Hahn'sche Preßmethode würde hier angewendet sicherlich eine vollständige Klärung dieser Fragen bringen.

Wie die Versuche von Fermi und Montesano mit lebenden Kulturen ergaben, spaltet der Micrococcus pyogenes tenuis bei der Zucht um 30° C in Bouillon mit 3 Proz. Amygdalin dieses Glukosid. Das gleiche bewirkt der aus faulendem Substrat isolierte Bacillus emulsinus und der Bacillus thermophilus gleicher Herkunft bei 60° C. Zucker als intermediäres Produkt konnte dabei niemals festgestellt werden, was wir wohl einer raschen Gärung der entstandenen Dextrose zuschreiben müssen. Außerdem spalten inkonstant Amygdalin in der Kultur Vibrio Metschnikovi, von 5 untersuchten Colistämmen 3, und ein Stamm von Bacillus typhi. Sehr unsicher zeigte in der mit 3 Proz. Amygdalin versetzten Bouillonkultur die Amygdalinspaltung Bacillus diphtheriae, Bacillus megatherium und Sarcina aurantiaca. Wenn man bedenkt, daß Fermi und Montesano 70 Mikrobenarten auf ihre Amygdalin spaltenden Fähigkeiten untersuchten, so ist die Zahl der positiven Befunde allerdings sehr gering.

---

[1]) Fermi und Montesano, Zentralbl. f. Bakt., I. Abt., Bd. 15, 1894.

Gérard[1]) konnte ebenfalls eine Amygdalinzerlegung durch Bakterien feststellen.

In jüngster Zeit prüfte Twort[2]) eine Reihe von 44 Bakterienarten, hauptsächlich der Typhus-, Paratyphus- und Coligruppe angehörig, auf das Vermögen, die verschiedensten Glukoside (49 an der Zahl) zu spalten. Davon erwiesen sich 27 Glukoside spaltbar. Von den untersuchten Mikroorganismen spalteten folgende Bakterien folgende Glukoside[3]).

Bacillus dysenteriae Kruse,
Bacillus dysenteriae Flexner, } Iridin und Senegin (mit Säurebildung)
Bacillus typhosus Eberth,

Bacillus paratyphosus Schrottmüller: Iridin und Senegin (mit Säure- und Gasbildung) Euonymin (braun und grün) (mit Gasbildung).

Bacillus enteritidis Gärtner,
Bacillus paratyphosus Brion und Kayser, } Euonymin (braun und grün) (mit Gasbildung), Iridin und Senegin (mit Säurebildung)

Bacillus paracoli Widal: Euonymin (braun und grün) (mit Gasbildung), Iridin (mit Säurebildung), Senegin (mit Säure- und Gasbildung).

Bacillus acidi lactici Hueppe: Euonymin braun und Coronillin (mit Gasbildung); Euonymin grün, Iridin, Senegin, Coniferin, Arbutin, Salizin, Syringin, Quillajasäure, Populin (mit Säure- und Gasbildung).

Bacillus coli Escherich: Euonymin braun, Camellin, Globularin (mit Gasbildung); Euonymin grün (mit Säurebildung); Iridin, Senegin, Coniferin, Arbutin, Syringin und Quillajasäure (mit Säure- und Gasbildung).

Bacillus pneumoniae Friedländer: Euonymin braun, Camellin, Periplocin, Cathartinsäure Coronillin (mit Gasbildung); Amygdalin, Phloridzin (mit Säurebildung); Euonymin, Iridin, Senegin, Coniferin, Arbutin, Salizin, Syringin, Quillajasäure, Populin, Cerberid, Sapotoxin, Saponin, Bryonin, Strophantin, Gratiolin (mit Säure- und Gasbildung).

Bacillus pyogenes foetidus Passet: Iridin, Senegin, Coniferin, Arbutin, Salizin, Syringin, Quillajasäure, Populin (mit Säurebildung); Euonymin grün (mit Säure- und Gasbildung).

Bacillus neapolitanus Emmerich: Euonymin braun, Globularin, Sapotoxin (mit Gasbildung); Euonymin grün, Iridin, Senegin, Coniferin, Quillajasäure (mit Säure- und Gasbildung.

Bacillus capsulatus Pfeiffer: Euonymin braun, Camellin, Globularin, Periplocin, Cathartinsäure, Convallamarin, Digitalin (mit Gasbildung); Saponin, Phloridzin, Amygdalin

---

[1]) Gérard, M. E., Compt. rend. de la soc. de Biologie, Année 1896.

[2]) Twort, Proceedings of the Royal Society London, Ser. B., Bd. 79, 5. Juni 1907.

[3]) Es sind hier nur die Hauptvertreter der nicht verwandten Arten aufgeführt. In Bezug auf die Einzelheiten sei auf das Original verwiesen.

(mit Säurebildung); Euonymin grün, Iridin, Senegin, Coniferin, Arbutin, Salizin, Syringin, Quillajasäure, Populin, Cerberid, Sapotoxin, Bryonin, Strophanthin, Coronillin, Gratiolin (mit Säure- und Gasbildung).

Bacillus lactis aerogenes Escherich: Euonymin braun, Globularin, Canthartinsäure (mit Gasbildung); Amygdalin, Saponin, Phloridzin (mit Säurebildung); Euonymin grün, Iridin, Senegin, Coniferin, Arbutin, Salizin, Quillajasäure, Cerberid, Sapotoxin, Bryonin, Strophanthin, Coronillin, Gratiolin, Baptisin (mit Säure- und Gasbildung).

Bacillus cloacae Jordan: Euonymin braun, Camellin, Canthartinsäure, Coronillin (mit Gasbildung); Populin, Amygdalin, Gratiolin, Phloridzin (mit Säurebildung); Euonymin grün, Iridin, Senegin, Coniferin, Arbutin, Salizin, Quillajasäure, Cerberid, Sapotoxin, Bryonin (mit Säure- und Gasbildung).

Nach diesen Untersuchungen von Twort müssen wir doch bei den Bakterien neben Emulsin auch an andere glukosidspaltende Enzyme denken; denn die zuerst genannten Bakterienarten besitzen auf Amygdalin keine Einwirkung, wohl aber auf andere Glukoside, wie Iridin, Senegin usw. Über die dabei erhaltenen Spaltungsprodukte besitzen wir zurzeit keine nähere Kunde, da wir nur aus den Tabellen entnehmen können, ob Säure- oder Gasbildung bei der Spaltung zu beobachten sind. Daraus kann aber auf die gebildeten Spaltungsprodukte kein Rückschluß gemacht werden, da ja in den lebenden Kulturen eine Anzahl von sekundären Prozessen sofort die abgespaltenen Komponenten weiter abbaut und verändert.

Wenn auch die Trennung der Glukosidspaltenden Enzyme von den Bakterien noch nicht gelungen ist, können wir für diese Spaltungen doch mit größter Wahrscheinlichkeit gruppen-spezifische Enzyme annehmen. Wie schon gesagt, sind für die Klärung der Frage nach der Existenz der Glukosid spaltenden Enzyme bei den Bakterien Preßsaftversuche dringend nötig.

Auch für das Emulsin gelingt die Gewinnung von Antiemulsin im Blutserum behandelter Tiere. Beitzke und Neuberg berichten über die synthetische Wirkung von Antiemulsin. Letzteres erhielten sie im Blutserum von Kaninchen, die mit Emulsin subkutan gespritzt worden waren. Die Globuline dieses Immunserums, die das Antiemulsin enthielten, bewirkten in einer konzentrierten Lösung von Galaktose und Glukose die Bildung eines noch nicht näher untersuchten Disaccharides.

Fett spaltende Enzyme.

Lipase.

Die in den Erdboden gelangten und die in Fäulnisgemischen befindlichen Fette unterliegen einer verhältnismäßig raschen Zersetzung, wobei eine Anzahl von Mikroorganismen eine wichtige Rolle spielt. Rubner unterzog die Zersetzung von Mandelöl in verschiedenen Erdproben einer eingehenden Untersuchung und gelangt dabei zu Ergebnissen, die die Mitwirkung verschiedener Mikroorganismen bei diesen Spaltungen und weiteren Zersetzungen zur Tatsache stempeln.

Ob nun die bakteriellen Fettspaltungen[1]) durch ein extrahierbares Enzym ausgelöst werden oder nicht, bildet eine strittige Frage. Viele Untersucher wollen in dem Fettspaltungsvermögen eine unmittelbare Tätigkeit des Protoplasmas erblicken, was zur Aufstellung der „Fettvergärung" (Rubner) führte. Nach zahlreichen Untersuchungen an höheren Pilzen und an Schimmelpilzen darf aber doch angenommen werden, daß es sich bei der bakteriellen Fettspaltung um einen enzymatischen Prozeß handelt, zumal am Vibrio cholerae dies durch Carrière experimentell nachgewiesen wurde. In höheren Pflanzen und bei Tieren fand man ebenfalls Stoffe, die fettspaltende Eigenschaften besitzen und infolge ihrer übrigen Eigenschaften den Enzymen zuzuzählen sind.

Die fettspaltenden Enzyme bezeichnet man als Lipasen oder Steapsine. Sie haben die Eigenschaft, Fette in Glyzerin und freie Fettsäuren zu spalten, entsprechend der allgemeinen Gleichung:

$$C_3H_5(O \cdot C_nH_{2n-1}O)_3 + 3H_2O = C_3H_5(OH)_3 + 3C_nH_{2n}O_2$$

Daraus ist die hydrolytische Natur dieser Fettspaltungen ohne weiteres zu entnehmen.

Ob die im Pflanzenreich zahlreich nachgewiesenen Lipasen untereinander verschieden sind, ist zurzeit noch nicht entschieden. Jedenfalls dürfte es aber so sein.

Im allgemeinen sind die Lipasen sehr empfindliche Enzyme, die besonders durch Alkalien leicht geschädigt werden. Weniger hindernd wirken die Säuren. Die vielen mißlungenen Extraktionsversuche gerade bei diesem Enzym dürften nicht in letzter Linie ihre Ursache in dieser großen Empfindlichkeit der Lipasen haben.

Aus den Untersuchungen von Rouge[2]) über das lipolytische Enzym des Lactarius sanguifluus Fr. entnehmen wir u. a., daß in verdünnten Lösungen die Enzymwirkung der angewendeten Enzymmenge direkt proportional ist. In konzentrierten Lösungen ist ein rascher Abfall der Wirkung zu verzeichnen. In den ersten Zeiten der Einwirkung ergibt sich für die Menge der gespaltenen Produkte und der Einwirkungszeit eine direkte Proportionalität. Wir haben hier also ähnliche Verhältnisse zu verzeichnen, wie bei der Invertasewirkung. Zwischen Reaktionstemperatur und Wirkungsstärke ist innerhalb von 20° und 45° ebenfalls eine annähernd direkte Proportionalität zu beobachten. Das Optimum für die Wirkung der Lipase von Lactarius sanguifluus Fr. liegt bei 45° C, während die Zerstörungstemperatur ungefähr 68° beträgt. Unter 20° C wirkt die Lipase nur sehr wenig auf Fette ein.

Wie schon auf Seite 7 mitgeteilt wurde, konnte eine Reversibilität des Vorganges der hydrolytischen Fettspaltung durch Lipase beobachtet werden.

Schütze[3]) gelang die Gewinnung einer Antilipase durch künst-

---

[1]) Vgl. Rahn, Otto, Die Zersetzung der Fette. Zentralbl. f. Bakt., II. Abt., Bd. 15, 1906. Hier Literaturübersicht über die Fettspaltung.

[2]) Rouge, E., Zentralbl f. Bakt., II. Abt., Bd. 18, 1907. Hier eine gute Literaturübersicht über pflanzliche Lipasen. — Außerdem findet sich eine zusammenfassende Darstellung über die bisherigen Forschungsergebnisse über tierische und pflanzliche Lipase bei Constein, W., Ergebnisse der Physiologie, Jahrg. III. Bd. I, 1904.

[3]) Schütze, A., Deutsche med. Wochenschr. 1904.

liche Immunisation von Kaninchen mit Steapsin. Das Blutserum der vorbehandelten Tiere hemmte die lipolytische Spaltung von Ricinusöl in Fettsäuren und Glyzerin.

Über die große Verbreitung der Lipase bei den Bakterien brachten uns die zahlreichen Untersuchungen über die Ursachen des Ranzigwerdens der Butter Mitteilungen.[1]) Auch die Veränderungen im Fettgehalt von Käsen führten zur Annahme von fettspaltenden Eigenschaften zahlreicher Käsebakterien. Nach Reinmann und Krueger ist Bacillus fluorescens liquefaciens fettspaltend. Reinmann konnte die Fettspaltung von Streptothrix alba nachweisen, während diese Eigenschaft nach Jensen auch der Streptothrix chromogena zukommt.

Eijkman[2]) wies für eine Anzahl verschiedener Mikroorganismen fettspaltende Eigenschaften nach. Dazu benutzte der genannte Forscher folgendes Verfahren: Der Boden einer Petri'schen Schale wurde mit einer dünnen Schicht von Fett, vornehmlich Rindertalg, bedeckt. Darüber wurde mit eben noch flüssigem Agar eine Platte gegossen, auf die die zu untersuchenden Bakterien verimpft werden. In Agar diffundierende Lipasen zersetzten dann den Talg in charakteristischer Weise. Es entstehen dort weiße, undurchsichtige Flecke, die mit dem abgehobenen Agar mitgehen. Der Talg wurde brüchig und verseift, wobei besonders Kalkseifen und wenig Natron- und Ammoniakseife gebildet worden sind. Mit diesem Verfahren konnte Eijkman bei Bacillus pyocyaneus, Bacillus fluorescens, Bacillus prodigiosus, Bacillus indicus, Bacillus ruber und Staphylococcus pyogenes aureus mehr oder weniger kräftige Fettspaltung feststellen. Bei Bacillus pyocyaneus und Staphylococcus pyogenes aureus konnte die Fettspaltung auch in der Wasserstoffatmosphäre nachgewiesen werden. Schreiber fand bei anaërober Zucht ebenfalls Fettspaltung, wenn auch in geringerem Ausmaße als bei Sauerstoffzutritt.

Krueger berichtet über die fettspaltenden Eigenschaften eines Bacillus fluorescens non liquefaciens, die in einer Zerlegung der Triglyzeride des Milchfettes in Glyzerin und Fettsäuren bestanden.

Nach den Untersuchungen von Escherich über die fettspaltenden Bakterien des Säuglingskotes sollen zu ihnen der Bacillus subtilis, Streptococcus gracilis, Bacillus lactis aerogenes und mit sehr variabler Wirksamkeit auch Bacterium coli gehören. Von anderer Seite wurde zwar dem Bacillus subtilis und dem Bacterium coli das Fettspaltungsvermögen abgesprochen oder an ihnen nicht beobachtet.

Nach Sommaruga wurde in Gelatine suspendiertes Fett vom Vibrio cholerae, Vibrio Finkler-Prior, Vibrio Metschnikovi, Bacillus typhi, Bacillus Ribbert, Bacillus pyocyaneus und Micrococcus tetragenus gespalten. Öl in sehr geringem Maße wurde zerlegt vom Bacillus capsulatus Pfeiffer und Spirillum Deneki, Rinderfett nur gelegentlich.

Schreiber stellte Versuche mit säurefreiem Mandelöl und fettspaltenden Bakterien an und fand lipolytische Wirkungen bei Bacillus

---

[1]) Vgl. hierzu auch Weigmann, H., Das Ranzigwerden der Butter und Butterfehler, in Lafars Handbuch der Technischen Mykologie, Bd. II., S. 210ff.

[2]) Eijkman, Zentralbl. f. Bakt., I. Abt., Bd. 29, 1901.

fluorescens liquefaciens, Bacillus pyogenes, einem Bacillus φ, Vibrio Finkler-Prior und endlich Micrococcus tetragenus. Dabei konnte nicht nur eine Fettspaltung, sondern auch eine weitere Fettzerstörung beobachtet werden.

Diese wenigen Beispiele werden genügen, um die weite Verbreitung von fettspaltenden Eigenschaften bei den Bakterien darzutun.

Damit ist aber die Enzymnatur dieser bakteriellen Fettspaltung noch nicht dargetan, zumal die Ansicht vertreten wird, daß die Fettspaltung durch Bakterien unter dem unmittelbaren Einflusse des Bakterienprotoplasmas geschähe. Die Versuche von Schreiber sprechen in der Tat dafür. Der genannte Autor züchtete Massenkulturen eines fettspaltenden Bazillus in Peptonwasser und versetzte diese Kulturen im Verhältnis von 1 : 1000 mit Thymol. Diese desinfizierten Kulturen äußerten auf Mandelöl keine spaltenden Eigenschaften. Damit ist aber die Nichtexistenz einer Lipase durchaus nicht erwiesen. Wir finden bei Schimmelpilzen und auch höheren Pilzen Lipasen, die verhältnismäßig leicht extrahiert werden können und solche, die sich noch nicht darstellen ließen oder nur nach Zertrümmern der Zellen. Damit ist ein Wink für die einzuschlagende Untersuchungstechnik gegeben. Es wäre dringend notwendig, eine Trennung des Enzymes von lipolytisch wirksamen Bakterien mit der Buchner-Hahn'schen Preßmethode zu versuchen.

Übrigens gelang es Carrière, die Existenz einer Lipase beim Tuberkelbazillus nachzuweisen. Sechs Monate alte Kulturen dieses Mikroorganismus erzeugten schon innerhalb von 20 Minuten bei 37° C eine deutliche Säuerung in Monobutyrin enthaltenden Flüssigkeiten. Diese Wirkung wurde schon durch minimale Kulturmengen ausgelöst. Auch konnte durch Erhitzen diese Fähigkeit der Kultur sofort genommen werden, während ein geringer Zusatz von antiseptischen Stoffen keinerlei Störung der Spaltung bewirkte. Auch Dialyse vermochte die Lipase, um die es sich in diesem Falle handelte, nicht aus der Kultur zu entfernen.

Nach den zahlreichen Befunden an Schimmelpilzen sind wir berechtigt, auch bei den Bakterien, insonderheit mit Anlehnung an den Carrière'schen Versuch, eine Lipase, also ein Enzym, für die Fettspaltung verantwortlich zu machen.

Über die Natur der Bakterienlipase läßt sich nach den vorliegenden Literaturangaben nichts weiter aussagen. Ebensowenig ist eine Entscheidung der Frage möglich, ob die Lipasen der einzelnen fettspaltenden Bakterien verschieden sind oder nicht.

Oxydasen.

Unter Oxydasen[1]) verstehen wir Enzyme, die durch Übertragung von Sauerstoff eine Oxydation herbeiführen. Sie spielen im Stoffwechsel der Pflanzen und Tiere eine bedeutende Rolle und sind dementsprechend sehr weit verbreitet.

---

[1]) Vgl. Czapek, Biochemie der Pflanzen, Jena 1905, und Oppenheimer, Die Fermente, wo sich die gesamte Literatur über die Oxydasen und deren Verbreitung im Tier- und Pflanzenreich findet.

In Pilzen wiesen Bourquelot und Bertrand eine der Lakkase (siehe Seite 13) ähnliche Oxydase nach, indem sie durch den aus Pilzen ausgepreßten Saft eine Bläuung von Quajaktinktur erhielten, die nach dem Aufkochen dieser Säfte ausblieb. Die durch Ausziehen von Russula foetens Pers. mit Chloroformwasser erhaltene Flüssigkeit verleiht der Gallussäure die Eigenschaft, Sauerstoff beträchtlich zu absorbieren. Hydrochinon wird bei Gegenwart dieses Pilzextraktes zu Wasser und Chinon oxydiert. Aus Pyrogallol bildet sich Purpurogallin, das als rotes Pulver ausfällt. Lakkase leitet am leichtesten die Oxydation von denjenigen Polyphenolen ein, deren Hydroxylgruppen eine Ortho- oder Parastellung einnehmen, während die entsprechenden Metaverbindungen schwieriger angegriffen werden. Die genannten Reaktionen zeigen allerdings die Anwesenheit einer Oxydase an, doch sagen sie über ihre Spezifizität nichts aus. Übrigens ist die Gegenwart von Mangan für die Lakkasewirkung von großer Wichtigkeit und ist deshalb eine gewisse Vorsicht bei der Deutung dieser Vorgänge am Platze.

Die Oxydasen scheinen eiweißartige Substanzen zu sein, deren Stickstoff-Kohlenstoffverhältnis von dem der Eiweißkörper doch weit abweicht. Die Analyse des aus dem Milchsaft von Rhusarten durch einen Überschuß von Alkohol neben Gummi ausgefällten stickstoffhaltigen Körpers, der das oxydierende Enzym enthält, ergibt nach Yoshida 63.44 Teile Kohlenstoff, 7.41 Teile Wasserstoff, 4.01 Teile Stickstoff, 22.04 Teile Sauerstoff und endlich 1.2 Teile Asche. Die oxydierenden Eigenschaften verliert dieser Körper bei 63° C.

Oxydasen werden durch die für die übrigen Enzyme genannten Fällungsmittel (Alkohol usw.) gefällt. Sie erweisen sich gegen Säuren, Alkalien, Schwermetallsalze und Fluorverbindungen empfindlich und werden durch deren Gegenwart in ihrer Wirkung gehindert. Im allgemeinen werden sie bei einer Temperatur um 70° C zerstört.

Oydierende Enzyme finden sich bei zahlreichen Bakterien. Von diesen Enzymen sind aber nur die Tyrosinase und die Azetase (Czapek) oder die Essigsäurebakterienoxydase besonders nachgewiesen.

Tyrosinase.

Die Tyrosinase[1]) ist eine Oxydase, die spezifisch auf Tyrosin wirkt, wobei letzteres in Homogentisinsäure übergeführt wird. Sie findet sich im Pilzreiche häufig mit der Lakkase vergesellschaftet, kann aber von letzterer getrennt werden. Bertrand zerrieb eine größere Menge frisch eingesammelter Russula delica Fries. zu einem Brei und verrührte mit dem gleichen Gewicht Chloroformwasser. Nach $1^1/_2$ Stunden wurde der Brei abgepreßt. Der Preßsaft wurde dann im Verhältnis von 2:3 mit 95proz. Äthylalkohol gefällt und der entstandene Niederschlag abfiltriert. Nach Einengen des Filtrates im Vakuum auf ungefähr $^1/_{10}$ des Volumens erhielt Bertrand eine Enzymlösung, die die Eigenschaften der Lakkaselösung aufwies, auf Tyrosin aber keine Wirkung äußerte. Der erste Niederschlag wurde nach Behandeln mit Chloroformwasser mit Alkohol im Überschuß neuerlich gefällt, der neu entstandene Niederschlag abgepreßt und bei 33° C ge-

---

[1]) Eine Geschichte des Tyrosins und der Tyrosinase findet sich bei Borgnino, Bull. de l'assoc. belge des Chim. T. 29.

trocknet. Aus diesem Pulver konnte durch Wasser eine Substanz herausgelöst werden, die Tyrosin oxydierte, nicht aber Hydrochinon oder Pyrogallol.

Bourquelot und andere haben noch in vielen anderen Pilzen Tyrosinase nachgewiesen.

Die Einwirkung der Tyrosinase auf Tyrosin macht sich zuerst durch eine Rotfärbung und später durch ein Nachdunkeln in braun bis schwarz bemerkbar.

Dieses Enzym ist sehr wenig hitzebeständig, denn eine Temperatur von 50° schädigt es bereits nennenswert. Zwischen 60 und 70° wird es in kurzer Zeit zerstört. Wo es mit Lakkase vereint vorkommt, läßt sich seine Wirkung durch sehr kurze Erwärmung auf 70° ohne Schädigung der Lakkase ausschalten. Besonders empfindlich zeigt sich die Tyrosinase gegen Säuren, etwas weniger gegen Alkalien.

Die Tyrosinase wirkt nur in Gegenwart des Luftsauerstoffs.

Gessard[1]) konnte durch Injektionen von Tyrosinase die hemmende Wirkung der Blutsera für die Tyrosinoxydation wesentlich erhöhen. Er erblickt darin das Auftreten einer künstlichen „Antityrosinase“ im Blutserum der mit Tyrosinase gespritzten Tiere.

Bei Bakterien scheint diese Oxydase ziemlich weit verbreitet zu sein, obgleich über sie nur in zwei Untersuchungen eingehender berichtet wird. Es ist ja eine bekannte Erscheinung, daß bei der Zucht vieler Bakterien auf Nähragar eine braune Verfärbung auftritt, die in der Folge mitunter sehr dunkel wird. In zahlreichen Fällen dürfte dieselbe auf eine Oxydation des bei der Eiweißzerlegung gebildeten Tyrosins zurückzuführen sein.

Gessard[2]) berichtet über eine Tyrosinase bei Bacillus pyocyaneus, die aber von der Bakterienzelle nicht getrennt werden konnte.

Weitere Befunde über Tyrosinase bei Bakterien bringt Lehmann[3]). In einzelnen Fällen bräunten Bakterien das Kultursubstrat nach Zusatz von Tyrosin. Eine Bräunung des Nährbodens tritt selbst ohne Zusatz von Tyrosin besonders bei der Zucht von Bacillus fluorescens non liquefaciens auf peptonhaltigen und zuckerfreien Nährmedien auf. In diesem Falle nimmt Lehmann eine Spaltung von Peptonen in Tyrosin an, das dann durch eine Tyrosinase oxydiert wird. Ein Zusatz von Tyrosin bewirkt aber auch in zuckerhaltigen Nährsubstraten eine braune Färbung.

Andere Angaben über Tyrosinasebildung bei Bakterien konnten zur Zeit in der Literatur nicht gefunden werden.

Essigsäurebakterienoxydase.

Schon lange wußte man, daß beim Stehen an der Luft in alkoholhaltigen Flüssigkeiten, wie Wein usw., Essigsäure entsteht. Die Oxydation des Äthylalkohols in Essigsäure wird hauptsächlich durch Bakterien besorgt, die in großer Zahl im Laufe der Zeit bekannt und genauer auf ihre biologischen Eigentümlichkeiten untersucht wurden. Außerdem wurde an einem Sproßpilz die Fähigkeit beobachtet, die Essiggärung zu bewirken.

---

[1]) Gessard, Annal. de l'Inst. Pasteur, T. 15, 1901.
[2]) Gessard, Compt. rend. de la société de biologie, Ser. 10, T. 5, 1902.
[3]) Lehmann, Münchner med. Wochenschr., Bd. 49, 1902.

Der Vorgang der Oxydation des Äthylalkohols zu Essigsäure verläuft nach der Gleichung:

$$CH_3CH_2OH + 2\,O = CH_3 \cdot COOH + H_2O,$$

wobei eine intermediäre Bildung von Azetaldehyd CH_3CHO anzunehmen ist. In der Tat kann Aldehyd auch meistens spurweise nachgewiesen werden. Der Prozeß geht also in zwei aufeinanderfolgenden Absätzen vor sich, indem der Äthylalkohol zuerst zu Azetaldehyd und dann weiter zu Essigsäure oxydiert wird.

Man rechnete diesen durch die Essigbakterien bewirkten Oxydationsvorgang schon seit längerer Zeit zu den Fermentprozessen, doch eine Trennung desselben von der lebenden Zelle gelang erst vor kurzem.

E. Buchner und Meisenheimer[1]) konnten im Jahre 1903 ein Trockenpräparat von toten Essigbakterien gewinnen, das eine Oxydation in alkoholhaltigen Flüssigkeiten bewirkte. Zur Herstellung dieser Daueressigbakterien benützten sie die von Albert, E. Buchner, und Rapp[2]) ausgearbeitete Azetonmethode für Dauerhefe, wobei die lebenden Kulturen nach kurzem Abpressen in einem großen Überschuß von Azeton rasch eingetragen und nach 10 Minuten langem Verweilen durch Absaugen auf einem gehärteten Filter möglichst vom Azeton befreit werden. Dann erfolgt eine abermalige Behandlung durch 2 Minuten mit Azeton, das wieder abgesaugt wird. Schließlich wird mit wenig Äther übergossen, darin die Hefe gut verteilt und nach 3 Minuten dauerndem Verweilen der Äther abgesaugt und der Rückstand als fein zerriebenes Pulver auf Filtrierpapier in dünner Schichte ausgebreitet. Nach einstündigem Lagern an der Luft bei gewöhnlicher Temperatur wird noch bei 45° C durch 24 Stunden getrocknet.

Auf das Enzym der Essigbildung wurden von den genannten Forschern Bieressigbakterien untersucht, welche nach Aussaat in Würze mit 4 Proz. Alkohol- und 1 Proz. Essigsäurezusatz in einigen Tagen bei 30° C dünne Häutchen auf der Oberfläche bildeten. Diese Häute wurden dann in Azeton eingetragen und daraus ein trockenes Pulver hergestellt, das eine graubraune Farbe zeigte. Es erwies sich als sehr reich an verschiedenen Enzymen, besonders Katalase, da es mit Wasserstoffsuperoxyd zusammengebracht Aufbrausen und Überschäumen der Flüssigkeit verursachte.

Buchner und Meisenheimer bezeichneten diese Azetonessigbakterien als Daueressigbakterien und die darin erhalten gebliebene Oxydase „Essigsäurebakterienoxydase“ (Acetase Czapek).

8.7 g Daueressigbakterien wurden mit Sand und Kieselgur zerrieben und unter Zusatz von 0.8 g Kalziumkarbonat in einem „pfahlwurzelförmigen Gefäß“ mit 120 cm³ 4 proz. Äthylalkohol zusammengebracht. Zur Verhinderung von Infektionen wurden noch 4 cm³ Toluol zugesetzt.

---

[1]) E. Buchner und Meisenheimer, Enzyme bei Spaltpilzgärungen. Berichte der Deutsch. chem. Gesellschaft, Bd. 36, 1903.

[2]) Albert, Buchner, E., und Rapp, R., Berichte der Deutsch. chem. Gesellsch., Bd. 35, 1902, S. 2376. Vgl. auch den Bericht von Lindner, Aus den Verhandlungen der Sektion VI, Gärungsgewerbe und Stärkefabrikation; V. internat. Kongreß f. angewandte Chemie in Berlin (Zentralbl. f. Bakt., II. Abt., Bd. 10, 1903), worin Buchners Vortrag mit Demonstration der Daueressig- und Dauermilchsäurebakterien kurz referiert ist.

Nachdem durch 3 Tage bei 30° C Luft durch das Gemisch durchgeleitet worden war, ergab die chemische Analyse die Bildung von 0.4 g Essigsäure.

Die Essigsäurebakterienoxydase wird bei Gegenwart von Wasser bei einer Temperatur von 90—100° rasch zerstört.

Rothenbach und Eberlein[1]) wiederholten die Buchner-Meisenheimer'schen Versuche mit Reinkulturen des Bacterium pasteurianum in kohlensäurefrei gemachtem pasteurisiertem Bier. Die Bakterienzogloëen wurden durch Dekantieren und Abpressen möglichst vom stark essigsäurehaltigen Nährsubstrat befreit und durch Verreiben auf einem feinmaschigen Drahtsieb mit einer scharfen Drahtbürste zerkleinert. Nach Absaugen wurde der Filterrückstand zuerst mit Azeton und dann mit Äther behandelt und bei gewöhnlicher Temperatur im Vakuum getrocknet.

Zum Gärversuch wurden 10 g der getrockneten Azetonbakterien mit sterilem Wasser und sterilen Geräten mit Seesand und Kieselgur zerrieben, mit 140 cm^3 4proz. Alkohol gemischt und unter Beigabe von 1 g Kalziumkarbonat und 6 cm^3 Toluol bei 30° C unter Durchleiten von filtrierter Luft aufgestellt. Ein gleichzeitiger Parallelversuch ohne Durchlüftung und ohne Alkoholzugabe wurde ebenfalls angestellt. Nach 3 Tagen ergab der Inhalt des alkoholhaltigen Kolbens eine Gesamtmenge von 0.3174 g Essigsäure, während der alkoholfreie Versuch eine Essigsäuremenge von 0.248 g aufwies. Die Differenz beider Bestimmungen ergibt demnach 0.0694 g Essigsäure, die durch Enzymtätigkeit gebildet wurde.

Rothenbach und Eberlein überzeugten sich noch durch Abimpfen von Proben, daß in dem Trockenpräparat der Essigbakterien keine lebenden Zellen mehr vorhanden waren.

Eduard Buchner und Gaunt[2]) stellten dann noch hauptsächlich mit Bacterium aceti Hansen ein Daueressigbakterienpräparat her, das sie möglichst von dem daran haftenden Essig befreiten. Die damit angestellten Versuche der Essigsäurebildung ergaben für 17.4 bezw. 20 g Dauerbakterien eine Essigsäuremenge von 0.09 bezw. 0.40 g. Dabei war es gleichgültig, ob zerriebene oder intakte Daueressigbakterien Verwendung fanden. Die im Bakterienpräparat enthaltene Essigsäuremenge aus der Kultur schwankte zwischen 0.0005 und 0.0025 g für 1 g Trockenpräparat.

Die mit diesem Dauerbakterienpräparat und höheren Alkoholen, wie Propylalkohol, angestellten Versuche ergaben, daß die Essigbakterienoxydase auch höhere Alkohole zu oxydieren vermag.

Wenn auch bei diesen Versuchen die endgültige Ausbeute an Essigsäure mitunter sehr klein ausfiel, so ist damit doch der Beweis dafür erbracht, daß die Äthylalkohol oxydierende Tätigkeit der Essigbakterien auf ein Enzym zurückzuführen ist. Die Anwendung anderer Darstellungsmethoden wird vielleicht zur Gewinnung wirksamerer Enzympräparate führen, an denen noch die Einflüsse der verschiedensten Reagentien und physikalischen Faktoren zu untersuchen sind.

---

[1]) Rothenbach und Eberlein, Deutsche Essigindustrie, Bd. 9.
[2]) E. Buchner und Gaunt, Wochenschr. f. Brauerei, Bd. 22.

Reduzierende Enzyme.

Reduktasen.

Reduktionsvorgänge spielen im Leben der Mikroorganismen eine große Rolle. Bei überaus zahlreichen Bakterien konnten von den verschiedensten Autoren reduzierende Eigenschaften beobachtet werden, die sich in einer Entfärbung, bezw. Umbildung der zugesetzten Farbstoffe in Leukoverbindungen kundtun. Schon bei Kulturen in den mit Lackmus oder Methylenblau gefärbten Kultursubstraten stellt sich innerhalb kürzerer oder längerer Zeit eine Entfärbung ein, die durch Schütteln an der Luft wieder verschwindet. Es gäbe eine lange Liste, wollte man alle Bakterien hier aufzählen, die reduzierende Eigenschaften besitzen[1]). Zum Nachweis bediente man sich einer Reihe der verschiedensten Farbstoffe, die im Kulturmedium in einer Dosis gelöst wurden, die das Wachstum zumindest nicht nennenswert beeinträchtigt. Als solche Farbstoffe dienten vor allem Lackmus, Methylenblau, Indigokarmin, dann Vesuvin, Gentianaviolett, Methylviolett u. a. m. Außerdem verwendeten Scheurlen und Klett mit Erfolg Natrium selenosum und Natrium telurosum.

Über die eigentliche Ursache der Reduktion in Bakterienkulturen sind die verschiedenen Forscher zweifacher Meinung. Ein Teil derselben nimmt an, daß es sich bei den Reduktionen um eine vitale Tätigkeit des lebenden Bakterienplasmas handelt, während der andere Teil derselben der Anschauung huldigt, daß das Zellplasma besondere Stoffe bildet und ausscheidet, die diese sauerstoffentziehenden Wirkungen äußern. Für letztere Annahme spricht sehr der Umstand, daß in festen Kulturen sich die Reduktionswirkung weit über den Wachstumsbezirk der Bakterien hinaus erstreckt. Daß es sich dabei um thermolabile Substanzen handeln muß, geht schon aus dem Versuche von Spina und Rothenberger hervor, die durch Erwärmen der Kulturen auf 60° (70°) jede weitere Reduktionswirkung ausschalteten. Immerhin sind diese Experimente nicht für die Enzymnatur der fraglichen Stoffe beweisend, da durch die Erhitzung auch die lebenden Zellen mit abgetötet wurden und demnach auch beim Fehlen eines Enzymes die Ergebnisse gleich sein müßten.

Eine wesentliche Stütze fand die enzymatische Erklärung der bakteriellen Reduktionsvorgänge durch die Untersuchungen von Cathcart und Hahn[2]).

Nachdem sie die näheren Umstände des Auftretens der Reduktionswirkungen einer genaueren Prüfung unterzogen, versuchten sie aus Cholera- und Colikulturen wirksame Preßsäfte zu erhalten, doch ohne Erfolg. Erst Azetondauerbakterien, die durch vorsichtiges einhalb- bis einstündiges Erhitzen auf 107° im Vakuum sicher sterilisiert waren, erwiesen sich als schwach reduzierend.

Aus anderen Versuchen ging mit Sicherheit hervor, daß die redu-

---

[1]) Vgl. die Untersuchungen von Cahen, Spina, Roszahegyi, Maaßen, Müller, Smith, Wolff, Behring, Baginsky, Kitasato, Weyl, Scheurlen, Klett und Hoyer, wo noch eine reiche Literatur über das Vorkommen reduzierender Eigenschaften und Mittel zu deren Nachweis angegeben sind.

[2]) Cathcart und Hahn, M., Archiv f. Hygiene, Bd. 44, 1902 und Münchner med. Wochenschr. 1902.

zierende Wirkung zwar an das Protoplasma gebunden ist, wie am Preßsaft von gewaschenen Zellen zu erkennen ist, aber doch unter Umständen abgegeben werden kann. Durch die Einwirkung von antiseptischen oder desinfizierenden Agentien wird die Reduktionsfähigkeit herabgesetzt oder aufgehoben. Tiefe Temperaturen um 0° und Erwärmen auf 55—60° beeinträchtigt ebenfalls das Reduktionsvermögen.

Wir haben es also hier in der Tat mit einem Enzym zu tun, das wir im Gegensatz zur Oxydase als Reduktase bezeichnen und das besonders empfindlich ist, da es durch das für die meisten Enzyme fast unschädliche Toluol ebenfalls in kürzerer Zeit vernichtet wird. Die bakterielle Reduktase wird durch Licht aber nicht ungünstig beeinflußt und erträgt in trockenem Zustand Temperaturen über 100° C, wie wir oben schon gesehen haben. Das Optimum für die Wirkung liegt bei ungefähr 40° C.

Für die enzymatische Auffassung der meisten bakteriellen Reduktionswirkungen sprechen auch die Befunde Maaßens[1], die, mit Preßsäften angestellt, das oben Mitgeteilte bestätigen.

Über die Natur der bakteriellen Reduktasen wissen wir nichts. Es ist übrigens noch sehr zu überlegen, ob bei allen bakteriellen Reduktionsvorgängen diese Enzyme vorhanden sind. Eine Anzahl dieser Vorgänge kann mit gutem Rechte auf eine direkte Lebenstätigkeit der Zelle ohne Zutun eines Enzymes bezogen werden. Dabei sind in erster Linie die denitrifizierenden Bakterien im Auge zu behalten.

---

[1]) Maaßen, Arbeiten aus d. Kais. Gesundheitsamt Berlin, Bd. 21, 1904.

XII.

Gärende Enzyme.

Zymase. Urease. Milchsäureenzym.

Zymase.

Die für die Saccharomyzeten typische Vergärung von Zucker in Äthylalkohol und Kohlensäure der Formel nach

$$C_6H_{12}O_6 = 2\,C_2H_5OH + 2\,CO_2$$

finden wir auch bei einer Anzahl von Bakterienarten. Hier wird aber gewöhnlich nur eine geringe Menge Alkohol gebildet. Nach den grundlegenden Untersuchungen von H. und E. Buchner und M. Hahn [1]) wissen wir, daß diese Gärung nicht durch unmittelbare Tätigkeit des Zellplasmas bewirkt wird, sondern daß sie auch zellenfrei vor sich geht. Das unter innerer Sauerstoffverschiebung im Zuckermolekül letzteres spaltende Enzym bezeichnet man als Zymase, wofür auch ab und zu der Name Alkoholase gebraucht wird, der aber durch unrichtige Anwendung der Enzymnomenklatur entstand und deshalb zu vermeiden ist. Obgleich wir über die Natur der Zymase noch nicht unterrichtet sind, können wir trotz mancher gegenteiligen Meinung daran festhalten, daß sie ein lebloses Enzym ist und ihre Wirkung keineswegs in einem widerstandsfähigeren Rest von Leben besteht, der auch noch nach dem Behandeln der Zellen mit Azeton, Äther, Alkohol usw. erhalten bleibt.

Bei der alhoholischen Gärung treten immer eine Anzahl von Nebenprodukten auf, wie Bernsteinsäure, Glyzerin usw. Es läßt sich nun schwer entscheiden, woher diese stammen, bezw. wodurch sie gebildet werden. Jedenfalls sind dabei die toten Zellen und deren Zerfallsprodukte und die anderen dabei frei werdenden Enzyme zu berücksichtigen. Näheres über das Verhalten der Zymase gegen Filtration, deren chemische Einflüsse usw. wurde durch die Untersuchungen von Buchner und Hahn bekannt; doch kann hier von der Wiedergabe dieser schönen Versuche abgesehen werden, da sie sich auf Hefepreßsaft beziehen und überdies

---

[1]) H. und E. Buchner und M. Hahn, Die Zymasegärung. München 1903. In dieser monographischen Darstellung findet sich die Literatur über alkoholische Gärung, dann alles wichtige über Zymase und zellenfreie Gärung.

aus Bakterien eine Zymase noch nicht hergestellt wurde. Außerdem ist das Ergebnis der durch Bakterien ausgelösten alkoholischen Gärung doch anders als das der Saccharomyzetengärung, bei der ja über 90 Proz. des Zuckers in Alkohol und Kohlensäure umgesetzt werden. Bei den Bakterien handelt es sich dabei vielmehr um einen mehr nebenhergehenden Prozeß, durch den meistens nur geringe Alkoholmengen entstehen. Auch vermögen die Bakterien die verschiedensten Kohlenhydrate zu vergären, während die Hefen nur solche Kohlenhydrate angreifen, deren Molekül eine Kohlenstoffatomanzahl besitzt, die ein Vielfaches von drei ist.

Im allgemeinen ist eine Äthylalkoholbildung bei Bakterien weit verbreitet[1]).

Fitz erwähnt schon im Jahre 1873 den Äthylalkohol als Gärprodukt bei Spaltpilzen. Brieger und andere beobachteten beim Friedländerschen Pneumoniebakterium die Bildung von Alkohol aus Rohrzucker, Traubenzucker und Mannit. Nach Grimbert[2]) bewirken dem Pneumoniekokkus ähnliche Bakterien in Milchzucker und Glyzerin enthaltenden Nährsubstraten eine kräftige alkoholische Gärung, wobei als Nebenprodukt in verschiedenen Mengen immer Essigsäure, bei Glyzerin überdies noch Milchsäure und bei Milchzucker Bernsteinsäure auftritt.

Alkohol als Nebenprodukt findet sich in den Stoffwechselprodukten von zahlreichen Milchsäurebakterien und Buttersäurebakterien. Kruis und Rayman isolierten einen Milchsäurebazillus, der in Bierwürze Äthylalkohol, Ameisensäure, Essigsäure und Milchsäure bildete. Kayser fand bei Milchbakterien bis über 3 Proz. Alkoholbildung.

Nach Emmerling erzeugt Bacillus boocopricus aus Dextrose Äthylalkohol nebst R-Milchsäure und Spuren von Bernsteinsäure.

Kerry und Fränkel fanden bei der Zersetzung von Traubenzucker durch Bacillus oedematis maligni Äthylalkohol als ein Gärprodukt.

Der Bacillus aethaceticus vergärt eine Anzahl von Kohlenhydraten zu Äthylalkohol und Nebenprodukten (Ameisensäure, Essigsäure, Bernsteinsäure, Kohlensäure und Wasserstoff), wobei diese Produkte von der Art des vergärbaren Kohlenhydrates abhängen.

Die wenigen Beispiele werden genügen, um die große Verbreitung der Alkoholbildung bei den verschiedensten Bakterienarten zu zeigen. Damit ist aber die Liste derselben noch keineswegs geschlossen und es ließe sich noch eine große Anzahl von ihnen namhaft machen.

Für Hefeenzyme konnte Jacobsohn[3]) nach wiederholten Injektionen von Kaninchen und von einer Ziege mit „Zymin“ (Azetondauerhefe), aufgeschwemmt in 0.9 proz. Kochsalzlösung, Antikörperbildung im Blutserum dieser Tiere beobachten. In Bezug auf die Menge der gebildeten Antizymase herrschten bei ein und derselben Tierspezies große Unterschiede. Außerdem konnte das Antienzym im besten Falle nur die 3 bis 4fache Menge der zur Immunisierung verwendeten Enzymmenge paralysieren. Es besaß also im Vergleich zu anderen Immunseren eine sehr geringe Wirksamkeit.

---

[1]) Vgl. hierzu: A. Bau, Chemismus der Alkoholgärung, in Lafars Handbuch der technischen Mykologie, Bd. 4, S. 399 ff., dort eingehende Literatur über Alkoholbildung durch Bakterien.

[2]) Grimbert, Annales de l'Inst. Pasteur, T. 9, 1895.

[3]) Jacobsohn, Münchner med. Wochenschr. Jg. 50, 1903.

Urease.

Für den ununterbrochenen Kreislauf des Stickstoffes in der Natur sind jene Vorgänge von der größten Bedeutung, welche zur Bildung von kohlensaurem Ammoniak führen. Denn dieses kann durch weitere Oxydation in jene Salze übergeführt werden, die als Nahrung der Pflanzen in den weiteren Kreislauf eintreten. Gerade die Bakterien besorgen in großem Maße die Eiweißspaltung und entbinden auf diese Weise große Stickstoffmengen. Andrerseits werden aus dem tierischen Körper durch den Harn enorme Quantitäten von Stickstoff abgegeben, die dann durch die Harn vergärenden Bakterien in den Kreislauf neuerlich eingeführt werden. Unter den Zersetzungsvorgängen der stickstoffhaltigen komplizierteren Harnbestandteile nimmt die ammoniakalische Gärung[1]) gewiß nicht die letzte Stelle ein. Unter ammoniakalischer Gärung verstehen wir einen biologischen Vorgang, bei dem unter Wasseraufnahme der Harnstoff in Ammoniumkarbonat zerlegt wird. Dies erfolgt glatt nach der Formel:

$$CH_4N_2O + 2\,H_2O = (NH_4)_2CO_3$$

Diese Gärung bewirken in der Natur sozusagen überall vorkommende Bakterien. Sie gehören teils den Coccaceen, teils den Bacillaceen an. Am besten entwickeln sie sich in Temperaturen zwischen 20° und 32° C und entfalten ihre größte Tätigkeit bei ungefähr 30° C. Sie lassen sich unter Verwendung von schwach alkalischer, mit Harnstoff im Verhältnis von 2—5 proz. vermischter Peptongelatine leicht reinzüchten. Ein Zusatz von wenigen Zehntelprozent Ammoniumkarbonat ist ihrem Wachstum sehr förderlich, während eine größere Zugabe von Harnstoff ihrem Gedeihen hinderlich ist.

Die Zahl der mehr oder weniger verschiedenen Harnstoffbakterien ist sehr groß. Von ihnen wurden genauer untersucht:

Micrococcus liquefaciens, von Flügge[2]) näher untersucht. Bildet keine Sporen und erträgt Erwärmung auf 60—70° C nicht durch längere Zeit.

Urococcus van Tieghemi Miquel. (Micrococcus ureae Cohn). Wird schon durch längeres Erwärmen auf 47° C vernichtet und ist auch gegen Desinfektionsmittel äußerst empfindlich, besonders gegen $HgCl_2$.

Micrococcus Dowdeswelli, von Miquel[3]) untersucht. Schon nach einer Woche reichliche Enzymbildung.

Urosarcina Hansenii, von Miquel[3]) aus Luft und Wasser isoliert, verträgt eine feuchte Erwärmung auf 65° C durch 2 Stunden.

Urobacillus Schützenbergii I, von Miquel[4]) aus Kloakenabläufen gezüchtet. Wird schon durch eine zweistündige Einwirkung einer Temperatur von 45° vernichtet.

---

[1]) Vgl. die Zusammenstellung über Harngärung von Miquel, in Lafars Handbuch der technischen Mykologie, Bd. 3, S. 71 ff. Dort ist auch eine eingehende Beschreibung der betreffenden Bakterienarten und die Literatur darüber zu finden. Einzelne der folgenden darauf bezughabenden Verweise sind nach Miquel angegeben.

[2]) Flügge, Die Mikroorganismen. 3. Aufl. Bd. 2, 1896.

[3]) Miquel, Annal. de micrograph. Bd. 5, 1893.

[4]) Miquel, Annal. de micrograph. Bd. 3, 1891.

Urobacillus Schützenbergii II, von Cambier[1]) isoliert. Wird schon bei 42° C nach zwei Stunden getötet.

Urobacillus Miquelii, von Beijerinck[2]) reingezüchtet.

Staphylococcus pyogenes aureus, dessen Kulturfällungen ebenfalls stark Harnstoff zersetzend sind (Moll).

Bei den bisher genannten Bakterienarten wurde keine Sporenbildung beobachtet. Eine solche zeigen aber die übrigen genauer studierten Harnstoffbakterien, wie:

Planosarcina ureae Beijerinck,[2]) deren Sporen durch eine Temperatur von 80° C innerhalb 10 Minuten nicht getötet werden.

Urobacillus Pasteurii,[3]) dessen Sporen bei 87—90° selbst nach zwei Stunden nicht vernichtet werden.

Urobacillus Freudenreichii[4]) und Urobacillus Maddoxii,[5]) die eine Temperatur von 94° C über zwei Stunden überdauern.

Urobacillus Duclauxii, von Miquel (l. c. S. 114, Anm. 3) untersucht, erträgt eine zweistündige Einwirkung von 95° C.

Urobacillus Leubei Beijerinck,[2]) dessen Sporen selbst 100° C durch kurze Zeit ertragen.

Außer den genannten Bakterienarten existiert noch eine Anzahl von Harnstoffvergärern, die aber einer genaueren Beschreibung nicht unterzogen wurden, oder bei denen wenigstens nach den Untersuchungen Beijerincks[2]) die Fähigkeit, Harnstoff zu zersetzen, nicht auf ein Enzym zu beziehen ist, sondern auf eine direkte Plasmatätigkeit (katabolische Spaltung).

In den weitaus meisten Fällen vermögen die Harnstoff vergärenden Bakterien ein Enzym zu bilden, das auch losgelöst von der lebenden Zelle die typische Harnstoffzersetzung in kohlensaures Ammon bewirkt.

Schon Musculus wies im Jahre 1876 auf ein harnspaltendes Enzym hin, das bei verschiedenen Harnen Erkrankter eine Gärung erregt und von ihm als Produkt der erkrankten Harnblase angesehen wurde.

Das erste Mal konnte im Jahre 1890 Miquel[6]) bei Harnstoffbakterien das Enzym der ammoniakalischen Gärung nachweisen und bezeichnete es als Urase, welcher Name von ihm später in Urease umgewandelt wurde.

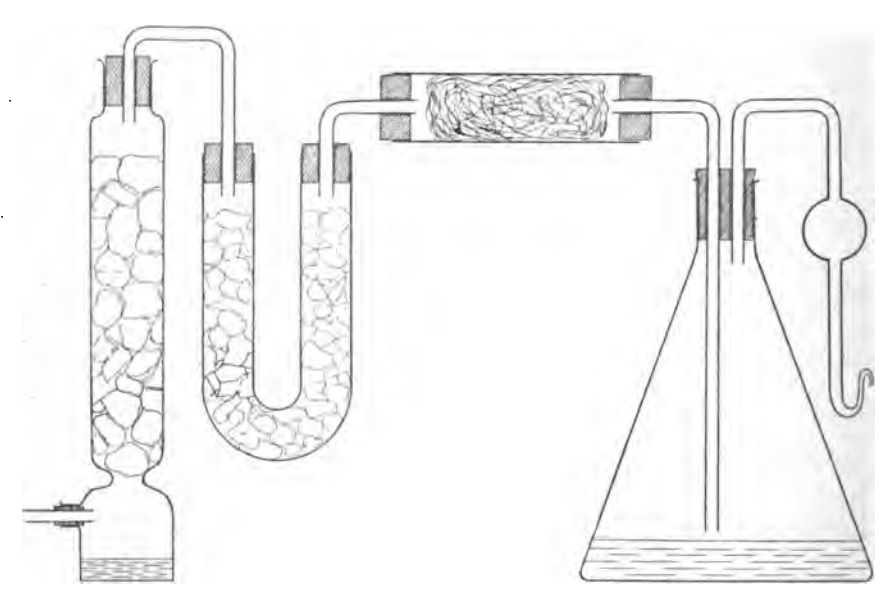
Trotz der gegenteiligen Anschauung Miquels gehört die Urease höchstwahrscheinlich zu jenen Enzymen, die nur äußerst schwierig oder vielleicht gar nicht von der lebenden oder toten Zelle zu trennen sind. Weder Beijerinck noch Moll[7]) konnten aus kräftig Harnstoff spaltenden Kulturen durch Filtration mit Porzellanfiltern ein wirksames Filtrat erhalten. Selbst gewöhnliches Filtrierpapier hielt den größten Teil des Enzymes mit den Bakterien zurück, denn das Filtrat erwies sich nach Beijerinck nur sehr wenig wirksam, während der Rückstand fast ebenso kräftig wirkte wie die ursprüngliche Kultur. Dazu ist noch zu bemerken, daß der genannte Forscher mit Kulturen des Urococcus ureae bei 30° C arbeitete, dessen Zellen aber bei dieser Tempe-

[1]) Cambier, Annal. de micrograph. Bd. 5, 1893.
[2]) Beijerinck, Zentralbl. f. Bakt., II. Abt., Bd. 7, 1901.
[3]) Miquel, Annal. de micrograph. Bd. 2, 1889.
[4 u. 5]) Miquel, Annal. de micrograph. Bd. 2 und 3.
[6]) Miquel, Compt. rend. de l'Acad. Paris, T. III, 1890.
[7]) Moll, Beitr. z. chem. Physiol. u. Patholog., Bd. 2, 1902.

ratur abgetötet werden, während die Urease gerade in der Wärme am besten wirkt. Die Annahme von Sheridan Lea[1]), daß die Urease vielleicht die toten Zellen verläßt, widerlegt Beijerinck dadurch, daß er Filtrationsversuche mit Kulturen ausführte, die durch Chloroformwasser getötet worden waren. Letzteres schädigt allerdings die Urease, doch zerstört sie nicht vollständig. Auch diese Versuche hatten das Ergebnis, daß die Filtrate auf Harnstoff vollständig unwirksam waren.

Für die Gewinnung einer möglichst wirksamen Urease ist die Einhaltung gewisser Kulturbedingungen nötig. Im allgemeinen soll für eine genügende Durchlüftung der Kulturen gesorgt werden. Außerdem soll der Nährboden durch sehr geringe Mengen zugesetzten Ammoniumkarbonates leicht alkalisch gemacht und eine geringe Menge (2—3 g auf 1000 Kulturflüssigkeit) Harnstoff zugesetzt werden. Das Temperaturoptimum liegt für die Zucht bei 30—35° C.

Für die Zucht in größeren Mengen eignet sich vorzüglich die in Figur 9 beschriebene Zusammenstellung. In den rechts befindlichen mindestens ein Liter fassenden Erlenmeyerkolben kommt die Kulturflüssigkeit in 2—3 cm dicker Schicht. Verschlossen ist der Kolben mit einem doppelt durchbohrten Kautschukstopfen, durch den ein bis unmittelbar über die Flüssigkeitsoberfläche reichendes Rohr und ein zweites bis knapp unter den Stopfen gehendes Rohr luftdicht eingeführt ist. Letzteres gestattet



Figur 9.

der eingeblasenen Luft freien Austritt, verhindert aber durch seine Biegung und Kugel das Rücksteigen von Bakterien aus der Luft. Das andere Rohr führt in ein steriles Wattefilter, welches luftdicht an ein U-Rohr und letzteres ebenso an einen Benetzungsturm angeschlossen ist. Das U-Rohr ist mit kleinen Bimsteinstückchen gefüllt, die mit einer wässrigen

[1]) Sheridan Lea, Journ. of. Physiology, Vol. 11, 1890.

Sublimatlösung von 1 : 500 getränkt sind. Der Benetzungsturm ist mit größeren Bimsteinstücken beschickt, die vollständig mit Wasser durchsetzt sind. Überdies befindet sich im unteren Teil des Turmes noch ein Überschuß von Wasser. Für den Gebrauch wird nun der Erlenmeyerkolben mit der Nährlösung in der angegebenen Höhe gefüllt. Miquel bezeichnet eine Peptonbouillon mit 2—3 g Harnstoff im Liter als sehr zweckmäßig. Moll verwendet zur Zucht der Harnstoffbakterien folgende Nährlösung: Liebigs Fleischextrakt 1 g, Dextrose 0.2 g, Ammoniumkarbonat 0.1 g in 100 cm^3 destilliertem Wasser. Dann wird mit dem Stopfen verschlossen und das Wattefilter angeschlossen. Hierauf wird der einerseits mit dem Wattefilter und andrerseits mit dem Kugelrohr verschlossene Kulturkolben der üblichen fraktionierten Sterilisation unterworfen.

Bei der Verimpfung der Reinkultur wird einfach unter den gewöhnlichen Vorsichtsmaßregeln der Stopfen gelüftet und dann etwas von der Kultur mit der Öse in die Nährflüssigkeit verimpft und rasch wieder geschlossen. Dann wird der beschickte Kolben mit dem Wattefilter an das U-Rohr angeschlossen und die ganze Zusammenstellung in den Thermostaten mit 30—35° C gebracht. Von einem Gasometer oder durch eine Druckpumpe wird nun ein schwacher Luftstrom dauernd über die Kultur geleitet. Derselbe passiert zuerst den Benetzungsturm, dann das U-Rohr mit Quecksilberchlorid und endlich das Wattefilter, gelangt dann keimfrei in das Kulturgefäß und von dort durch die Kugelröhre wieder ins Freie. Der mit Wasserdämpfen gesättigte Luftstrom trocknet bei dieser Anordnung nicht aus und die Vorlage eines Desinfektionsmittels und Wattefilters verbürgt die bakterienfreie Beschaffenheit desselben. Die Vorlage von Sublimat ist deshalb angezeigt, weil bei der feuchten Beschaffenheit des Wattefilters dorthin gelangte Schimmelsporen auskeimen und das Filter bei der langen Züchtungszeit von acht Tagen durchwachsen können, was zu unliebsamen Verunreinigungen der Massenkulturen führt.

Nach 8—14 tägiger Wachstumsdauer wird nach der Angabe von Moll die Kulturflüssigkeit samt den Bakterien mit überschüssigem Alkohol gefällt, der Niederschlag abfiltriert und bei 30—35° C getrocknet. In Wasser verrieben erhält man auf diese Weise einen wirksamen Brei, der neutral reagiert. Miquel gibt an, daß er durch einfaches Filtrieren mit Porzellanfiltern eine sehr wirksame Enzymlösung erhalten habe.

Für den Nachweis der stattgehabten Harnstoffzersetzung bestimmt Moll den restlichen Harnstoff nach der Methode von Mörner-Sjöquist.

Die Urease wirkt am energischsten bei 48—50° C bei gleichzeitiger Anwesenheit von Saccharose oder Glyzerin. In feuchtem Zustande wird sie durch Erwärmen auf 70—75° C innerhalb von zwei Stunden vernichtet, bei 80° C binnen einer Minute. Temperaturen unter 0° schädigen sie im Verlauf von mehreren Tagen. Das trockene Enzym ertrug nach Moll 70° C, wurde aber bei 80° ebenfalls zerstört.

Gegen Quecksilbersalze ist die Urease äußerst empfindlich, denn Sublimat wirkt schon in einer Verdünnung von 1 : 1000000 sehr nachteilig. Nach Miquel hindert Kupfersulfat im Verhältnis von 1:10000 gelöst, Borsäure 1:1000, Natronhydrat 1:250 und Karbolsäure 1 : 100. Toluol und Chloroform wirken auf dieses Enzym sehr schädlich. Nach Moll ist es aber gegen Natriumfluorid sehr widerstandsfähig, weshalb sich letzteres als desinfizierender Zusatz bei Ureaseversuchen

empfiehlt. Mineralsäuren vernichten die Urease schon in einer Verdünnung von 1:5000. Neutralsalze und Eiweiß beeinflussen die Urease in ihrer Wirkung gar nicht.

Die Wirkung der Urease auf Harnstofflösungen ist weiter abhängig von der Menge des Karbamids und der Reaktionszeit. In verdünnteren Harnstofflösungen erfolgt eine raschere Zersetzung. Steigt die Konzentration der Harnstofflösung auf 10 Proz., so ist die Wirkung schon sehr gering. Werden noch konzentriertere Lösungen verwendet, dann sinkt die Menge des zersetzten Harnstoffes sehr rasch. Erreicht die Harnstoffmenge in der Lösung 30 Proz. oder darüber, dann hört jede Zersetzung vollständig auf. Wie aus den Versuchen von Moll zu entnehmen ist, steigt mit zunehmender Einwirkungsdauer die Menge des zersetzten Harnstoffes.

Nach Miquel vermögen Kalkniederschläge die Urease an sich zu reißen und mitzufällen. Die Urease daraus wiederzugewinnen gelang aber nicht.

Aus den Untersuchungen von Moll geht hervor, daß das Blutserum normaler Kaninchen in wechselndem Maße hemmende Eigenschaften aufweist und daß es gelingt, durch vorsichtige künstliche Immunisierung von Kaninchen durch Injektionen mit kleinen Dosen des Enzymes eine hochwertige Antiurease zu erhalten. Weder die Antiurease des normalen Blutserums, noch des Serums immunisierter Tiere wird durch eine Erwärmung auf 56° C verändert, erstere nicht einmal durch Erhitzen auf 65° C. Durch subkutane Einspritzung von Urease, die durch Erhitzen auf 100° C zerstört wurde, konnte keine Antiurease erhalten werden.

Milchsäuregärungsenzym.

Im Laufe der Zeit wurde eine große Anzahl von Bakterienarten bekannt, die einfache Zucker zu Milchsäure verarbeiten. Es würde viel zu weit führen, wollte man die ganze Schar dieser Bakterien hier aufzählen[1]). Dieselben sind gegen Säuren, besonders Milchsäure, sehr empfindlich, denn schon bei einem Gehalte von 0,1 Proz. sistieren sie ihr Wachstum und ihre Tätigkeit. Wenn aber durch Zusatz von neutralisierenden Substanzen, wie kohlensaurer Kalk, für eine Bindung der freien Milchsäure gesorgt wird, dann geht der Prozeß viel weiter. In Milch bilden die bekannteren Milchsäurebakterien im Durchschnitt etwa 0.5—0.6 Proz. Milchsäure.

Die gebildete Milchsäure ist in den meisten Fällen die razemische oder optisch inaktive Modifikation. Häufig findet man die rechtsdrehende Fleischmilchsäure oder Paramilchsäure. Nencki und Sieber[2]) züchteten aus rauschbrandkranken Tieren eine Bakterie, die in zuckerhaltigen Nährsubstanzen die rechtsdrehende Modifikation der Milchsäure bildete. Sie nannten dementsprechend diesen Mikroorganismus Micrococcus acidi paralactici. Schardinger fand in Brunnen-

[1]) Vgl. Emmerling, Die Zersetzung stickstofffreier Substanzen durch Bakterien, Braunschweig 1902, und auch Weigmann, „Die Gärungen der Milch und der Abbau ihrer Bestandteile“ in Lafars Handbuch der Technischen Mykologie, Bd. 2, 1905.

[2]) Nencki und Sieber, Monatshefte für Chemie, Wien, Bd. 10, 1889.

wasser eine Milchsäure bildende Bakterienart, Bacillus acidi laevolactici, die aber aus Rohrzucker die linksdrehende Modifikation der Milchsäure erzeugte. Daneben entstanden noch ein Gasgemisch, das vornehmlich aus Kohlensäure und einem brennbaren Anteil bestand, und Äthylalkohol. Schardinger gelang es auch, durch Erwärmen von Salzlösungen der Rechtsmilchsäure mit solchen der Linksmilchsäure die inaktive Verbindung zu erhalten. Aus saurer Milch und aus der Maische wurden noch eine Anzahl verschiedener Milchsäurebildner gezüchtet. Außerdem sind sie in der Natur weit verbreitet. Es gibt obligat aërobe und anaërobe Formen, die neben der Kohlenhydratquelle noch eine besondere Stickstoffquelle zur Verfügung haben müssen. Letztere kann im allgemeinen einfacher Natur sein, denn nach Timpe genügen schon Salze des Ammoniaks. Besser sind aber Peptone als Stickstoffquellen.

Die Milchsäuregärung der Hexosen verläuft in einfacher Weise nach der Formel:

$$C_6H_{12}O_6 = C_3H_6O_3 + C_3H_6O_3$$

Diese Zersetzung geschieht entsprechend der Gleichung ohne Aufnahme von Wasser, womit aber keineswegs sichergestellt ist, daß bei dem enzymatischen Vorgange der Milchsäuregärung eine vorübergehende Wasseraufnahme ausgeschlossen ist.

Durch die Milchsäuregärung werden aber nicht ausschließlich einfache Hexosen in Milchsäure zerlegt, sondern auch Mannit usw., und endlich nach den Angaben von Tate[1]) Rhamnose. Außerdem unterliegen dieser Gärung u. a. auch Saccharose und Laktose. Hier erfolgt die Zersetzung insofern komplizierter, als diese Kohlenhydrate höchstwahrscheinlich zuerst durch ein anderes Enzym hydrolisiert werden und die Spaltungsprodukte erst der eigentlichen Milchsäuregärung unterliegen.

Dieser Vorgang läßt sich vielleicht durch folgende Gleichungen wiedergeben:

$$C_{12}H_{22}O_{11} + H_2O = 2\,C_6H_{12}O_6 = 4\,C_3H_6O_3$$

Die gebildete Gärungsmilchsäure, also die razemische Modifikation, kann von den Milchsäurebakterien weiter als Nährstoff verarbeitet werden. Dies geschieht entweder dadurch, daß nur die eine oder andere Komponente in größerer oder geringerer Menge verzehrt wird, wodurch dann eine Modifikation im Überschuß neben der inaktiven Gärungsmilchsäure übrig bleibt, oder es findet eine gleichmäßige Verzehrung beider Modifikationen statt, was dann inaktive Milchsäure als resistierendes Produkt ergibt. Wenn nun eine Komponente vollständig aufgezehrt wird, bleibt nur die andere zurück, wie z. B. beim Bacillus acidi laevolactici Schardinger oder Micrococcus acidi paralactici. Auf alle Fälle können wir annehmen, daß infolge der Gärung als primäres Produkt die razemische Verbindung gebildet wird.

Bis vor kurzem galt gerade die Milchsäuregärung als typisches Beispiel für die sogenannten organisierten Fermente, da es nicht gelingen wollte, die Gärung unter Ausschaltung der lebenden Milchsäurebakterien zu erhalten. Daß es sich dabei aber um einen rein enzymatischen Vor-

---

[1]) Tate, Journal of the chemic. Soc. London, Vol. 63, 1893.

gang handelt, haben die Untersuchungen von Buchner und Meisenheimer[1]) und endlich von Herzog[2]) unzweideutig dargetan.

Buchner und Meisenheimer züchteten den Bacillus Delbrücki (Leichmann) im Großen in hochprozentiger Würze bei 40—45° C. Der durch Zentrifugieren der Kulturen erhaltene Bakterienrückstand wurde einmal gewaschen und abermals ausgeschleudert. Darnach wurde der Rückstand in 20 Teile Azeton eingetragen, auf einem Filter gesammelt, nach Waschen mit Azeton noch mit Äther behandelt und im Vakuum getrocknet. Ein Liter Bakterienkultur gab auf diese Weise etwas mehr als 1 g trockenes, schwach gelbbraunes Pulver von esterartigem Geruch. Für den Gärversuch wurde dieses Milchsäurebakterienpräparat mit dem gleichen Gewichte Quarzsand und wenig Wasser zerrieben, wodurch innerhalb von 10 Minuten fast alle Zellen zerrissen worden waren. Zur Gärung wurde eine Rohrzuckerlösung mit Toluol und dem zerriebenen Pulver (und geringen Mengen von kohlensaurem Kalzium) aufgestellt.

Auf diese Weise erhielten Buchner und Meisenheimer mit 4.3 g Dauerbakterien in 20 cm^3 Wasser mit 4 g Saccharose und 0.2 cm^3 Toluol nach 2 Tagen bei 40—45° C 0.07 g Milchsäure. Bei einem anderen Versuch mit 6.5 g Dauermilchsäurebakterien, 35 cm^3 Wasser, 7.5 g Rohrzucker, 1 g Kalziumkarbonat und 1 cm^3 Toluol im Erlenmeyerkolben mit Meißlschem Schwefelsäuregärverschluß bei 30° C bekamen die genannten Forscher nach 6 Tagen entsprechend der Kohlensäuremenge 1.1 g Milchsäure.

Herzog erhielt auf andere Weise ein wenig gärkräftiges Milchsäurebakterien-Dauerpräparat. Milchsäurebakterienkulturen wurden mit Kieselgur geschüttelt, dann abgesaugt und gut abgepreßt. Dann wurde der Bakterienrückstand in fein verteilter Form in eiskalten Methylalkohol oder noch besser in Methylformiat auf 10 Minuten eingetragen. Nach Abgießen der Flüssigkeit wurde der Bakterienbrei einige Minuten mit Äther verrührt, abgesaugt und im Brütschrank rasch getrocknet. Nach einigen Stunden erhielt Herzog ein schneeweißes geruchloses Pulver. Wie schon gesagt, konnte dieses Dauerpräparat nur geringe Mengen von Milchsäure aus Milchzucker bilden und brauchte dazu sehr lange Zeit. Die entstandene Milchsäure wies Herzog auf mikrochemischem Wege durch Kobalto-Baryumlactat[3]) nach.

Von Herzog wurden auch Versuche gemacht, das Milchsäureenzym mit Hilfe der Preßmethode zu gewinnen, doch gelang es nicht, einen keimfreien Preßsaft zu erhalten. Die mit Milchzucker und Preßsaft von Bacterium acidi lactici Hueppe erhaltene Säuerung konnte daher keinen einwandfreien Beweis für die Gärtätigkeit des Preßsaftes erbringen.

Über die physikalischen und chemischen Eigenschaften des Milchsäuregärungsenzymes kann zur Zeit nichts ausgesagt werden.

Aus dem, was bisher über die Bakterienenzyme bekannt wurde, können wir entnehmen, daß eine große Anzahl von bakteriellen Zersetzungsvorgängen auf eine Enzymwirkung zurückzuführen ist. Ein und

[1]) Buchner, E, und Meisenheimer, Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch., Bd. 36, 1903, S. 634 ff.
[2]) Herzog, R. O., Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. 37, 1902/03.
[3]) Vgl. H. Behrens, Mikrochemische Analyse 1897, Heft 4, S. 46.

dieselbe Bakterienart verfügt über eine Reihe von verschiedenen Enzymen, die nebeneinander oder nacheinander in Aktion treten. Wenn wir aber die durch Bakterien hervorgerufenen Zersetzungen näher verfolgen, so stoßen wir noch auf zahlreiche Umsetzungen, für die weder bei den Bakterien noch bei den übrigen Lebewesen ein spezielles Enzym nachgewiesen wurde. Einen Teil dieser Vorgänge können wir gewiß ohne weiteres der unmittelbaren Lebenstätigkeit der Mikroben zuschreiben. Für den Rest dürfen wir aber nur mit Vorsicht die Annahme eines Enzymes zur Erklärung heranziehen. Hier handelt es sich eben nur um Hypothesen, denn ein experimenteller Beweis steht noch aus.

Zu den letztgenannten Gärungen gehört vor allem die Buttersäuregärung und Butylalkoholgärung, für die eine große Anzahl von Erregern bekannt wurde. Auch die weit verbreitete Schleimgärung ist hierher zu rechnen. Außerdem können zahlreiche Oxydationsvorgänge, wie die Oxydation von Xylose zu Xylonsäure durch Bacterium xylinum, oder die Oxydation des Ammoniaks zu Nitrit und weiter zu Nitrat oder die Bildung von Schwefel und Schwefelsäure aus Schwefelwasserstoff durch besondere Oxydasen bewerkstelligt gedacht werden. Das Gleiche gilt für eine Anzahl von Reduktionsvorgängen, wie wir sie bei der Denitrifikation und bei der Schwefelwasserstoffbildung aus Sulfaten durch Bakterien finden. Auch hier können spezifische Reduktasen im Spiele sein. Von den Bakterien werden noch viele Umsetzungen durchgeführt, die hier zu nennen wären.

Nachdem wir uns aber die Aufgabe gestellt haben, die experimentell erwiesenen Bakterienenzyme in den Kreis unserer Betrachtung zu ziehen und jene Vorgänge bei Bakterien höchstens zu streifen, die bei höheren Organismen erwiesenermaßen durch Enzyme hervorgebracht werden, so liegt kein Grund vor, auf die soeben mitgeteilten Gärungen näher einzugehen.

Immerhin gewinnt man bei der intensiveren Beschäftigung mit den Bakterienenzymen den Eindruck, daß gerade auf diesem Gebiete noch eine Riesenarbeit zu leisten ist, deren Ergebnisse aber sicherlich manche Lebensrätsel zu entschleiern vermögen.



Benützte Literatur.

Abderhalden, E. und Emmerling, O., Abbau von Gliadin durch den Bacillus mesentericus vulgatus. Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. 51, 1907.

Abderhalden, E. und Koelker, H., Die Verwendung optisch aktiver Polypeptide zur Prüfung der Wirksamkeit proteolytischer Fermente. Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. 51, 1907.

Abott, C., A study of the proteolytic enzymes and of the socalled hämolysins of some of the common saprophytic bacteria. Journ. of med. research, Boston, Vol 10.

Achalme, P., Recherches sur quelques bacilles anaérobies et leur differenciation. Annal. de l'Inst. Pasteur, T. 16, 1902.

Albert, R., Buchner, E. und Rapp, R., Herstellung von Dauerhefe mittels Aceton. Ber. d. Deutsch. chem. Gesellsch., Bd. 35, 1902.

Arrhenius, Svante, Immunochemie. Deutsch von A. Finkelstein. Leipzig 1907.

Aschoff, L., Ehrlichs Seitenkettentheorie und ihre Anwendung auf die künstlichen Immunisierungsprozesse. Sep. d. Zeitschr. f. allgem. Physiol., Bd. 1, 1902, als Neudruck bei G. Fischer, Jena 1905.

Auerbach, W., Ueber die Ursache der Hemmung der Gelatine-Verflüssigung durch Bakterien durch Zuckerzusatz. Archiv f. Hyg., Bd. 31, 1897.

Baginsky, Ueber Gährungsvorgänge im kindlichen Darmcanal. Deutsche med. Wochenschr. 1888.

Bail, Ueber leukocide Substanzen in den Stoffwechselprodukten von Staphylococcus pyogenes aureus. Zeitschr. f. Hyg., Bd. 30.

Barlow, B. siehe Harrison.

Baswitz, M., Zur Kenntnis der Diastase. II. Mitt. Ber. d. Deutsch. chem. Gesellsch., Bd. 12, 1879.

— Zur Kenntnis der Diastase. Vortrag. Ber. d. Deutsch. chem. Gesellsch. Bd. 11, 1878.

Behrens, J., Die Pektingärung. Lafars Handbuch d. techn. Mykologie, Bd. 3, Kap. 10.

Behring, Ueber Lackmusgefärbte Agarnährböden. Zeitschr. f. Hyg., Bd. 7.

Beijerinck, M. W., L'auxanographie on la methode de l'hydrodiffusion dans le gélatine appliquée aux recherches microbiologiques. Archiv. Néerlandaises, T. 23, 1888; Ref. Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Bd. 7, 1890.

— Die Laktase, ein neues Enzym. Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Bd. 6, 1889.

— Ueber Butylalkoholgährung und das Butylferment. Verhandlungen d. K. Akad. v. Wetenschappen te Amsterdam, Tweede Sect., Deel I. Ref. Kochs Jahresber., Jg. 4, 1893.

— Ueber Nachweis und Verbreitung der Glukase, das Enzym der Maltose. Centralbl. f. Bakt., II. Abt., Bd. 1, 1895.

— Anhäufungsversuche mit Ureumbakterien. Ureumspaltung durch Urease und durch Katabolismus. Centralbl. f. Bakt., II. Abt., Bd. 7, 1901.

— und Van Delden, A., Over de bacterien, welke bij het roten van vlas werkzaam zijn. Verslag van de Gewonne Vergadering der Wis-en Natuurk., Deel 12, 1903. (Zitiert nach Behrens in Lafars Handb. d. techn. Mykol., Bd. 3, S. 278.)

Beitzke und Neuberg, Zur Kenntnis der Antifermente. Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Ref., Bd. 35, 1904.

Bertrand, Sur la présence simultanée de la laccase et de la tyrosinase dans le suc de quelques champignons. Compt. rend. de l'acad. Paris, T. 123, 1896.
Biffen, Annals of botany, Bd. 13, 1899.
Bitny-Schlachto, W. von, Zur Lehre von der Lipase. Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Ref., Bd. 35, 1904.
Bitter, H., Über die Fermentausscheidung des Koch'schen Vibrio der Cholera asiatica. Archiv f. Hyg., Bd. 5, 1886.
Boekhout, F.W.T. und Ott de Vries, J. J., Ueber eine die Gelatine verflüssigende Milchsäurebakterie. Centralbl. f. Bakt., II. Abt., Bd. 12, 1904.
Bokorny, Th., Katalyse, Fermentgärung und fermentfreie Gärung. Wettendorfers Zeitschr. f. Spiritus-Industrie 1907.
Borgnino, C., Tyrosin und Tyrosinase. Bull. de l'associat. belge des chim., T. 29.
Bourquelot, E., Présence et rôle de l'émulsine dans quelques champignons parasites des arbres on vivant sur le bois. Compt. rend. de la soc. de biolog. Paris, 1893.
— Présence d'un ferment analogue à l'émulsine dans les champignons et en particulier dans les champignons parasites des arbres on vivant sur le bois. Compt. rend. de l'acad. Paris, T. 117, 1893.
— Remarques sur les ferments solubles sécretés par l'Aspergillus niger v. Tgh. et le Penicillium glaucum Link. Compt. rend. de la soc. de biol. Paris 1893.
— Sur la présence générale dans les champignons d'un ferment oxydant agissant sur la tyrosine. Bull. de la soc. mycol de France, T. 13, Fasc. 2, 1897.
— et Hérissey, H., Sur l'existence, dans l'orge germée, d'un ferment soluble agissant sur la pectine. Compt. rend. de l'acad. Paris, T. 127, 1898.
Brachin, A., Recherches sur la lactase. Journ. de pharm. et chim., T. 20.
— Eine kritische Studie der Methoden zum Laktasennachweis, ebendort.
Breymann, Margarete, Über Stoffwechselprodukte des Bacillus pyocyaneus. Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Bd. 31, 1902.
Brown and Morris, The non-cristallisable products of the action of diastase on starch. Journ. of the chemic. society London, Vol. 47, 1885.
— The amylodextrin of W. Nägeli and its relation to soluble starch. Journ. of the chemic. society London, Vol. 55, 1889.
Brunton L. und MacFayden, The ferment-action of Bacteria. Proceedings of Royal Soc. London, Vol. 46, 1889.
Buchner, E. und Meisenheimer, J., Enzyme bei Spaltpilzgährungen. Ber. d. Deutsch. chem. Gesellsch., Bd. 36, 1903.
— und Gaunt, R., Neue Versuche über die Oxydase der Essigbakterien. Wochenschr. f. Brauerei, Bd. 22.
— siehe Lindner.
Buchner, Hans, Gewinnung von plasmatischen Zellsäften niederer Pilze. Münchener med. Wochenschr., Jg. 44, 1897.
Bulloch, W. und Hunter, W., Über Pyocyanolysin, eine hämolytische Substanz in Kulturen des Bacterium pyocyaneum. Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Bd. 28, 1900.
Cahen, Über das Reduktionsvermögen der Bakterien. Zeitschr. f. Hyg., Bd 2.
Calamida, D., Das Hämolysin des Bacillus der Hühnercholera. Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Orig., Bd. 35, 1904.
Cambier, Annal. de mikrograph., Bd. 5, 1893. (Zitiert nach Miquel.)
Caminiti, Die morphologischen Veränderungen der roten Blutkörperchen in der durch die Toxine der Staphylokokken und anderer Bacillen hervorgebrachten experimentellen Hämolyse. Centralbl. f. allgem. Pathol. und pathol. Anat., Bd. 17, 1906.
Cannon, M. S., Invertase. Country Brewers Gazette 1903.
— Die Eiweißstoffe und die proteolytischen Produkte. Allgem. Brauer- und Hopfenztg., Jg. 44, 1904.
Carrière, G., Sur l'existence d'un ferment soluble dans les cultures de bacilles de Koch. Compt. rend. de la soc. de biol. Paris, der ganzen Reihe 53. Bd., 1901.
Casagrandi, Annali d'igiene sperim. Vol. 12, Fasc. 4.
Cathcart, E. und Hahn, M., Über die reduzierenden Wirkungen der Bakterien. Archiv f. Hyg., Bd. 44, 1902.
— siehe Hahn, M.
Cavazzani, E., Zur Kenntnis der diastatischen Wirkung der Bakterien. Centralbl. f. Bakt., I. Abt, Bd. 13, 1893.
Chudiakow, N., Zur Lehre von der Anaërobiose, I. T., Moskau 1896, russisch. Ref. Centralbl. f. Bakt., II. Abt., Bd. 4, 1898.

Clairmont, P. siehe Kraus, R.
Condelli, Bacteriolisi da sostanze chimiche. Annal. d'Igiene sperim. 1904.
Conn, W. H., Ueber einen bittere Milch erzeugenden Micrococcus. Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Bd. 9, 1891.
— Isolierung eines „Lab"-Fermentes aus Bakterienkulturen. Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Bd. 12, 1892.
— Bacteria in the dairy. The isolation of rennet from bacteria cultures. Zitiert nach Ref. Zentralbl. f. Bakt., I. Abt., Bd. 16, 1894.
Connstein, W., Ergebn. d. Physiol., Jg. III, Bd. 1, 1904.
— , Hoyer, E. und Wartenberg, Ueber fermentative Fettspaltung. Ber. d. Deutsch. chem. Gesellsch., Bd. 35, 1902.
Czapek, Biochemie der Pflanzen. Jena 1905.
Danilewsky, zitiert nach Kurajeff, Beitr. z. chem. Physiol. u. Patholog., Bd. 1, 1902, S. 121.
Dastre, A., Löslichkeit und Wirksamkeit der löslichen Enzyme in alkoholischen Flüssigkeiten. Compt. rend. de l'Acad. Paris, T. 121.
Dawson, Der Mechanismus der Enzym- und Fermentwirkung. Übersetzung in d. Zeitschr. f. Spiritus-Industrie, 1906.
Delbrück, M., Die Anwendung der Enzymforschung auf die Essiggärung. Deutsche Essigindustrie, Jg. 7, 1903.
Delden, van siehe Beijerinck.
Delezenne, C., Les kinases microbiennes. Leur action sur le pourvoir digestif du suc pancreátique vis-à-vis de l'albumine. Compt. rend. de l'Acad Paris, T. 135.
Denys und Vandevelde, Sur la production d'une antileucocidine chez les lapins vaccinés contre le staphylocoque pyogène. La Cellule, T. 11.
Detmer, Über den Einfluß der Reaktion Amylum sowie Diastase enthaltender Flüssigkeiten auf den Verlauf des fermentativen Prozesses. Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. 7, 1882.
Detre, L. und Sellei, J., Die hämolytische Wirkung des Tetanusgiftes. Wiener klin. Wochenschr. 1905.
— und —, Sind die normalen Serumlipoide Träger oder bloß Vermittler von Antiwirkungen, ebendort 1906.
Dienert, Sur la sécrétion des diastases. Compt. rend. de l'Acad. Paris, T. 129, 1899.
Dietrich, A., Sind alle Einwände gegen die Natur und Wirkungsweise der sogenannten Nukleasen widerlegt? Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Orig., Bd. 31, 1902.
Duclaux, E., Le lait. Paris 1887.
— Sur les ferments des matières albuminoïdes. Compt. rend. de l'Acad. Paris, T. 91.
— Traité de microbiologie. T. II. Diastases, toxines et venins. Paris, 1899.
— Sur une propriété les diastases. Compt. rend de l'Acad. Paris, T. 143, 1906.
Dungern, von, Bericht über eine neue Serumreaktion. Münch. med. Wochenschr., Jg. 45, 1898.
Durme, P. van, Ueber Staphylokokken und Staphylolysine. Hyg. Rundschau, 1903.
Eberlein siehe Rothenbach.
Effront, J., Les enzymes et leurs applications. Paris 1899. Davon deutsch von Dr. Max Bücheler, der 1. Bd.: Die Enzyme der Kohlenhydrate und die Oxydasen. Leipzig, 1900.
— Ueber die Wirkung der Amidosäuren auf Diastase. Allgem. Brauer- und Hopfenztg.. Jg. 45, 1905.
Eijkman, C., Ueber Enzyme bei Bakterien und Schimmelpilzen. Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Orig., Bd. 29, 1901 u. Bd. 35, 1904.
— Milchagar als Medium zur Demonstration der Erzeugung proteolytischer Enzyme. Centralbl f. Bakt., II. Abt., Bd. 10, 1903.
Emmerich, R, Sind alle Einwände gegen die Natur und Wirkungsweise der sogen. Nukleasen widerlegt? Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Orig., Bd. 31, 1902.
— und Löw, O., Die künstliche Darstellung immunisierender Substanzen (Nukleasen-Immunproteide) und ihre Verwendung zur Therapie der Infektionskrankheiten und zur Schutzimpfung an Stelle des Heilserums. Zeitschr. f. Hyg., Bd. 36, 1901.
—, — und Korschun, A., Die bakteriolytische Wirkung der Nukleasen und Nukleasen-Immunproteide als Ursache der natürlichen und künstlichen Immunität. Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Orig., Bd. 31, 1902.
Emmerling, O., Über einen neuen aus Glyzerin Buttersäure erzeugenden Bacillus. Ber. d. Deutsch. chem. Gesellsch, Bd. 29, 1896.

Emmerling, O., Beitrag zur Kenntnis der Eiweißfäulnis. Ber. d. Deutsch. chem. Gesellsch., Bd. 29, 1896.
— Die Zersetzung von Fibrin durch Streptokokken. Ber. d. Deutsch. chem. Gesellsch., Bd. 30, 1897.
— Die Einwirkung des Sonnenlichtes auf die Enzyme. Ber. d. Deutsch. chem. Gesellsch., Bd. 34, 1901.
— Die Zersetzung stickstoffreier organischer Substanzen durch Bakterien. Braunschweig 1902.
— und Reiser, O., Zur Kenntnis Eiweiß spaltender Bakterien. Ber. d. Deutsch. chem. Gesellsch., Bd. 35, 1902.
— siehe Abderhalden.
Escherich, Th., Die Darmbakterien des Säuglings. Stuttgart 1886.
Fermi, Cl., Die Leim und Fibrin lösenden und die diastatischen Fermente der Mikroorganismen. Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Bd. 7, 1890.
— Die Leim und Fibrin lösenden und die diastatischen Fermente der Mikroorganismen. Archiv f. Hyg., Bd. 10, 1890.
— Weitere Untersuchungen über die tryptischen Enzyme der Mikroorganismen. Centralbl. f. Bakt, I. Abt., Bd. 10, 1891.
— Weitere Untersuchungen über die tryptischen Enzyme der Mikroorganismen. Archiv f. Hyg., Bd. 14, 1892.
— Beitrag zum Studium der von den Mikroorganismen abgesonderten diastatischen und Inversionsfermente. Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Bd. 12, 1892.
— Stickstofffreie Mikroorganismen und Enzyme? Centralbl. f. Bakt., II. Abt., Bd. 2, 1896.
— Reagentien und Versuchsmethoden zum Studium der proteolytischen und gelatinolytischen Enzyme. Archiv f. Hyg., Bd. 55, 1906.
Fermi, Cl. und Montesano, G., Ueber die Dekomposition des Amygdalins durch Mikroorganismen. Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Bd. 15, 1894.
— und — Die von den Mikroben bedingte Inversion des Rohzuckers. Centralbl. für Bakt., II. Abt, Bd. 1, 1895.
— und Pernossi, L., Über die Enzyme. Zeitr. f. Hyg., Bd 18, 1894.
— und Repetto, R., Beitrag zur Verbreitung der proteolytischen Enzyme im Tierreiche. Centralbl. f. Bakt., I. Abt. Orig., Bd. 31, 1902.
Fernbach, A., Recherches sur la sucrase, diastase inversive du sucre de canne. Paris 1890.
Ficquet siehe Grimbert.
Fischer, Emil, Über den Einfluß der Konfiguration auf die Wirkung der Enzyme. Ber. d. Deutsch. chem. Gesellsch., Bd. 27, 1894 und Bd. 28, 1895.
— und Frankland-Armstrong, Darstellung der Osone aus den Osazonen der Zucker. Ber. d. Deutsch. chem. Gesellsch, Bd. 35, 1902.
Flügge, C., Die Aufgaben und Leistungen der Michsterilisierung gegenüber den Darmkrankheiten der Säuglinge. Zeitschr. f. Hyg., Bd. 17, 1894.
— Die Mikroorganismen, 3. Aufl., Bd. 2, 1896.
Fraenkel, C. und Baumann, Ueber Hämolysinbildung und Agglutination der Staphylokokken. Münch. med. Wochenschr. 1905.
Fränkel, Sig. und Hamburg, M., Über Diastase. I. Mitt. Versuche zur Herstellung von Reindiastase und deren Eigenschaften. Beitr. z. chem. Physiol. u. Patholog., Bd. 8, 1906.
— siehe Kerry.
Frankland-Armstrong siehe Emil Fischer.
Friedenthal, H., Über eine neue Methode zur Bestimmung der Wirksamkeit von Fermentlösungen. Centralbl. f. Physiol, Bd. 13, 1899.
— und Miyamota, S., Über die chemische Natur des Pepsins und anderer Verdauungsenzyme. Centralbl. f. Physiol., Bd. 16.
Fuld, E., Ueber das Zeitgesetz der Labung. Beitr. z. chem. Physiol. u. Patholog., Bd. 2, 1902.
— Über die Milchgerinnung durch Lab. Beitr. z. chem. Physiol. u. Patholog., Bd. 2, 1902.
Gaehtgens, W., Der Einfluß hoher Temperaturen auf den Schmelzpunkt der Nährgelatine. Arch. f. Hyg., Bd. 52.
Gamgee und Croft Hill, Über die optische Aktivität des Hämoglobins und Globins. Beitr. z. chem. Physiol. u. Patholog., Bd. 4, 1904.
— und Jones, Über die Nukleoproteide des Pankreas. Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol., Bd. 4, 1904.

Gaunt siehe Buchner, E.
Gérard, M. E., Présence dans le Penicillium glaucum d'un ferment agissant comme l'émulsine. Compt. rend. de la soc. de biolog., Bd. 45 d. g. R., 1893.
— Sur le dédoublement de l'économie. Compt. rend. de la soc. de biolog., Bd. 48 d. g. Reihe, 1896.
Gessard, C., Études sur la tyrosinase. Annal. de l'Inst. Pasteur, T. 15, 1901.
— Propriété nouvelle du bacille pyocyanique. Compt. rend. de la soc. de biolog., Ser. 10, T. 5, 1902.
Gläsner, K. und Roscules, V., Über den Einfluß der chemischen Zusammensetzung des Nährbodens auf die Immunkörper. II. T. Beeinflussung der Bakterienhämolysine, Bakterienfermente und deren Antikörper. Ztschr. f. experiment. Patholog., Bd. 3, 1906.
Gordon, M. H., Note on the ability of V. cholerae asiaticae to decompose starch. Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Orig., Bd. 42, 1906.
Gorini, C., Studi sperimentali sul latte. Atti dei labor. scientif. d. direz. della sanità publ., Roma 1890.
— Il fermento coagulante del bacillo prodigioso. Rivista d'Igiene e Sanità publ., Vol. 4, 1893.
— Das Prodigiosus-Labferment. Hyg. Rundschau, Bd. 3, 1893.
— Sopra una nuova classe di bacteri coagulanti del latte. Giorn. della R. Società Ital. d'Igiene, Vol. 16, 1894.
— Ueber die säure-labbildenden Bakterien der Milch. Centralbl. f. Bakt., II. Abt., Bd. 8, 1902.
Gottheil, O., Botanische Beschreibung einiger Bodenbakterien. Centralbl. f. Bakt., II. Abt., Bd. 7, 1901.
Gran, H. H., Studien über Meeresbakterien. II. Über die Hydrolyse des Agar-Agars durch ein neues Enzym, die Gelase. Bergens Museum, Aarbog 1902, H. 1.
Grassberger, R., und Schattenfroh, A., Ueber Buttersäuregärung. II. Abh. Archiv f. Hyg., Bd. 43, 1902.
Green, J. R., The action of light on diastase. Philosoph. Transactions of the R. Society, London, Ser. B, Bd. 188, 1897.
— Windisch, Die Enzyme, Berlin 1901.
Green, R. siehe Ward, M. H.
Grimbert, M. L., Fermentation anaérobie produite par le Bacillus orthobutylicus. Annal. de l'Inst. Pasteur, T. 7, 1893.
— Recherches sur le pneumobacille de Friedlaender. Études des fermentations provoquées par cet organisme. Annal. de l'Inst. Pasteur, T. 9, 1895.
— und Ficquet, L., Sur un nouveau ferment des tartrates, le Bacillus tartricus. Journ. de Pharm. et de Chim., Ser. VI, T. 7, 1898.
Grützner, Über Bildung und Ausscheidung von Fermenten, Pflügers Archiv, Bd. 16, 1878.
Haacke, P., Beiträge zur Kenntnis der quantitativen Zersetzung des Milchzuckers durch den Bacillus acidi lactici. Archiv f. Hyg., Bd. 42, 1902.
Hahn, M., Immunisierungs- und Heilversuche mit den plasmatischen Zellsäften von Bakterien. Münch. med. Wochenschr., Jg. 44, 1897.
— und Cathcart, Über die Reduktionswirkungen der Hefe und des Hefepreßsaftes, sowie der Bakterien. Münch. med. Wochenschr., Jg. 49, 1902.
— siehe Cathcart.
Hamburg, M. siehe Fränkel, S.
Hammarsten, O., Ueber die Milchgerinnung und die dabei wirkenden Fermente der Magenschleimhaut. Malys Jahrb. 1872.
— Ueber den chronischen Verlauf bei der Gerinnung des Caseïns mit Lab. Malys Jahrb. 1874.
— Zur Kenntnis des Caseïns und der Wirkung des Labfermentes. Malys Jahrb. 1877.
— Ueber das Verhalten des Paracaseïns zu dem Labenzym. Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. 22, 1896.
— Lehrbuch der physiologischen Chemie, 1896.
Harrison, F. C. und Barlow, B., New chromogenic Slime-Producing Organism. Transact. of the R. society of Canada, Sect. IV, 1905, II. Ser., Vol. 11.
Hastings, E. G., The action of various classes of bacteria on casein as shown by milk-agar plates. Centralbl. f. Bakt., II. Abt., Bd. 12, 1904.

Hata, S., Ueber einige Bakterienenzyme und deren Antikörper. Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Ref., Bd. 34, 1904.
Haubner, Magazin f. d. ges. Tierheilk., Bd. 18, 1852.
Hedin, S. G., Trypsin und Antitrypsin. Biochem. Journ., Bd. 1, 1906.
Heide, C. C. van der, Gelatinöse Lösungen und Verflüssigungspunkt der Nährgelatine. Archiv f. Hyg., Bd. 31, 1897.
Heinze, B., Über die Beziehungen der sogenannten Alinitbakterien — Bac. Ellenbachensis & Caron — zu dem Bac. megatherium de Bary bezw. zu den Heubazillen — Bac. subtilis Cohn —. Centralbl. f. Bakt., II. Abt., Bd. 8, 1902.
Henri, V., Lois générales des Diastases. Paris 1903.
— Action de l'invertine dans un milieu hétérogène. Compt. rend. de l'Acad. Paris, T. 142, 1906.
— und Lalou, S., Über die Einwirkungen von Emulsin auf Salicin und Amygdalin. Theorie der Emulsinwirkung. Compt. rend. de l'Acad. Paris, T. 136.
Henri et Mayer, Action des radiations du radium sur les ferments solubles. Compt. rend. de la soc. de biolog. 1904.
Herissey, H. siehe Bourquelot.
Hermann, A., Ueber die Verdauung des Fibrins durch Trypsin. Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. 11, 1887.
Herzog, R. O, Fermentreaktion und Wärmetönung. Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. 37, 1902.
— Über Milchsäuregärung. Zeitschr. f. physiol. Chem, Bd. 37, 1902.
— Über proteolytische Enzyme. Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. 39, 1903.
Hildebrandt, Virchows Archiv, Bd. 131, 1893.
Höber, R., Physikalische Chemie der Zelle und der Gewebe. II. Aufl. Leipzig, 1906.
Hoyer, D. P., Beiträge zur Kenntnis der Essigbakterien. Deutsche Essigindustrie, 1899.
Hüfner, G., Untersuchungen über „ungeformte Fermente" und ihre Wirkungen. Journ. f. prakt. Chem. (Bd. 113). neue Folge Bd. 5, 1872.
Hueppe, Ueber die Zersetzung der Milch und die biologischen Grundlagen der Gährungsphysiologie. Deutsche med. Wochenschr. 1884.
Hunter siehe Bulloch.
Huppert siehe Schütz.
Iterson, C. van, Die Zersetzung von Cellulose durch aërobe Mikroorganismen. Centralbl f. Bakt., II. Abt., Bd. 11, 1904.
Jacobsohn, L., Über Antikörperbildung nach Injektion von Zymase. Münch. med. Wochenschr., Jg. 50, 1903.
Jacobson, Untersuchungen über lösliche Fermente. Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. 16, 1892.
Jacoby, M., Über die Beziehungen der Verdauungswirkung und der Labwirkung. Biochem. Zeitschr., Bd. 1, 1906.
— Zur Kenntnis der Fermente und Antifermente. Biochem. Zeitschr., Bd. 2, 1906.
Jodlbauer, A., Über den Einfluß des Sauerstoffes bei der Schädigung der Fermente (Invertin) durch Wärme. Biochem. Zeitschr., Bd. 3, 1907.
— Über die Lichtwirkung auf Invertin bei Anwesenheit und Abwesenheit von Rohrzucker und anderen Stoffen. Biochem. Zeitschr., Bd. 3, 1907.
— und Tappeiner, Ueber die Wirkung des ultravioletten Lichtes auf Enzyme (Invertin). Deutsch. Archiv f. klin. Medizin, Bd. 87, 1906.
Jörgensen, A., Die Mikroorganismen der Gährungsindustrie. 3. Aufl., Berlin 1892.
Jones, L. R., The cytolytic enzyme produced by Bacillus carotovorus and certain other soft rot bacteria. Centralbl. f. Bakt., II. Aufl., Bd. 14, 1905.
— siehe Gamgee.
Jonescu, D., Über eine eigenartige Verdauung des Hühner- und Serumeiweiß durch Papain. Biochem. Zeitschr., Bd. 2, 1906.
Jordan, E., On the nature of pyocyanolysin. Transact. of the Chicago pathol. soc., 1902.
Kalischer, O., Zur Biologie der peptonisierenden Milchbakterien. Archiv f. Hyg., Bd. 37, 1900.
Katz, J., Die regulatorische Bildung von Diastase durch Pilze. Jahrb. f. Botanik, Bd. 31, 1898.
Kayser, E., Contribution à l'étude de la fermentation lactique. Annal. de l'Inst. nat. agronom., Ser. 2, T. 3.
Kayser, H., Ueber Bakterienhämolysine, im besonderen das Colilysin. Zeitschr. f. Hyg., Bd. 42, 1903.

Kerry, R. und Fränkel, S., Ueber die Einwirkung der Bazillen des malignen Ödems auf Kohlenhydrate. Monatshefte f. Chem., Wien, Bd. 11, 1890.
Kirchhoff, Ueber die Zuckerbildung beim Malzen des Getreides und beim Bebrühen seines Mehls mit kochendem Wasser. Schweig. Journ., Bd. 14, 1815.
Kitasato und Weyl, Zur Kenntnis der Anaëroben. Zeitschr. f. Hyg., Bd. 8.
Kjeldahl, Untersuchungen über die Zucker erzeugenden Fermente. Zeitschr. f. d. gesamte Brauwesen, 1880.
Klett, Ad., Zur Kenntnis der reduzierenden Eigenschaften der Bakterien. Zeitschr. f. Hyg., Bd. 33, 1900.
Klug, F., Untersuchungen aus dem Gebiete der Magenverdauung. Ung. Archiv f. Mediz., Bd. 3.
Koelker, siehe Abderhalden.
Kölle, M., Weiteres über Invertin. Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. 29, 1900.
Korschun, S., Sind im Labmolekül mehrere funktionierende Gruppen anzunehmen? Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. 37. 1902|03.
— siehe Emmerich.
Kozai siehe Loew.
Krabbe, G., Untersuchungen über das Diastaseferment unter spezieller Berücksichtigung seiner Wirkung auf Stärkekörner innerhalb der Pflanze. Jahrb. f. wiss. Botanik, Bd. 21. 1890
Kraus, R. und Clairmont, P., Über Hämolysine und Antihämolysine. Wiener klin. Wochenschr., Jg. 13, 1900.
— — Ueber Bakteriohämolysine und Antihämolysine. Wiener klin. Wochenschr. Jg. 14, 1901.
— und Lipschütz, B., Ueber Bakterienhämolysine und Antihämolysine. Zeitschr. f. Hyg., Bd. 46, 1904.
Krause, P., Ueber durch Pressung gewonnenen Zellsaft des Bacillus pyocyaneus. Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Orig., Bd. 31, 1902.
Krueger, R., Bakteriologisch-chemische Untersuchung käsiger Butter. Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Bd. 7, 1890.
Kruis und Rayman, Études chimique et biologique. P. II. Bull. de l'Acad. Bohême, 1894.
Kurajeff, D., Über die koagulierende Wirkung des Papayotins auf Peptonlösungen. Beitr. z. chem. Physiol. und Patholog, Bd. 1, 1902.
Kutscher und Konrich, Untersuchungen über die Beziehungen von Hämolysinbildung und Agglutinabilität der Staphylokokken. Zeitschr. f. Hyg., Bd. 48.
Laer, H. van, Zitiert nach Vandevelde, Biochem. Zeitschr., Bd. 3, 1907, S. 316.
Lawrow, D., Zur Kenntnis des Chemismus der peptischen und tryptischen Verdauung der Eiweißkörper. Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. 43.
Laxa, O., Über die Spaltung des Butterfettes durch Mikroorganismen. Archiv f. Hyg., Bd. 41, 1902.
Leck, I. van der, Aroma bildende Bakterien in der Milch. Centralbl. f. Bakt., II. Abt., Bd. 17, 1907.
Lehmann, K. B., Über die Bildung von Oxydationsfermenten (Tyrosinase) durch Bakterien. Münch. med. Wochenschr., Jg. 49, 1902.
Levy, E. und P., Ueber das Hämolysin des Typhusbacillus. Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Orig., Bd. 30, 1901.
Levy, P., Beitrag zur Kenntnis der Stoffwechselprodukte der Typhusbacillen. Inaug.-Diss. Straßburg 1902.
Levy, E. und Pfersdorff, F., Über die Gewinnung der schwer zugänglichen in der Leibessubstanz enthaltenen Stoffwechselprodukte der Bakterien. Deutsche med. Wochenschr. Bd. 28.
Lewin, E., Ueber Streptokokkolyse. Zitiert nach Ref. Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Ref., Bd. 35, 1904.
Liborius, P., Beiträge zur Kenntnis des Sauerstoffbedürfnisses der Bakterien. Zeitschr. f. Hyg., Bd. 1, 1886.
Liebermann, L. von, Sind die hämolytischen Immunkörper oder die Komplemente Katalysatoren, also Fermente. Deutsche med. Wochenschr. 1906.
Lindner, P., Aus den Verhandlungen der Sektion VI „Gärungsgewerbe und Stärkefabrikation“, V. internat. Kongreß f. angew. Chemie in Berlin. Buchners Vortrag über Milchsäure- und Essiggärung. Centralbl. f. Bakt, II. Abt., Bd. 10, 1903.
Lingelsheim, v., Aetiologie und Therapie der Staphylokokkeninfektion. Berlin 1900.

Linossier, Recherches et dosage de trypsine. Compt. rend. de la soc. de biolog., T. 52, 1900.
Lintner, Studien über Diastase. I u. II. Journ. f. prakt. Chemie, neue Folge, Bd. 34 u. 36.
Lippmann, E. O. von, Zur Nomenklatur der Enzyme. Ber. d. Deutsch. chem. Gesellsch, Bd. 36, 1903.
Lipschitz, siehe Kraus, R.
Loeb, A., Ueber Versuche mit bakteriellem Lab und Trypsin. Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Orig., Bd. 32, 1902.
Loew, O und Kozai, Th., Über Ernährungsverhältnisse beim Bacillus prodigiosus. Bull. of the coll. of agricult., Tokyo, Vol. 5.
— siehe Emmerich.
Lohr, Adam, Zur Frage der Hämolysinbildung pathogener Staphylokokkenstämme. Münch med. Wochenschr. 1905.
Lubenau, C., Hämolytische Fähigkeit einzelner pathogener Schizomyceten. Centralb. f. Bakt., I. Abt., Orig., Bd. 30, 1901.
Maassen, A., Ueber das Reduktionsvermögen der Bakterien und über reduzierende Stoffe in pflanzlichen und tierischen Zellen. Arb. aus d. kaiserl. Gesundheitsamte Berlin, Bd 21, 1904.
Mc Intyre, The intracellular toxin of bacillus pyocyaneus. Journ. of the Amer. med. Assoc. 1904
Madsen, Th., Ueber Tetanolysin. — Über Heilversuche im Reagenzglas. Zeitschr. f. Hyg., Bd. 32, 1899.
Malfitano, La bactériolyse de la bactéridie charboneuse. La Semaine medic., 1900.
— und Strada, Evaluation du pouvir protéolytique des bactéridies du charbon. Compt. rend. de la Soc. de biolog, 1905.
— — Des influences qui peuvent faire varier le pouvoir proteolytique des liquides en contact avec de bactéridies du charbon. Ebendort 1905.
Maquenne, L. und Roux, Eug., Recherches sur l'amidon la saccharification diastasique. Annal. de chim. et phys., T. 9, 1906.
Marcano, Fermentation de la fécule, présence d'un vibrion dans les graines de mais, qui cherm et dans la tige de cette plante. Compt. rend. de l'Acad. Paris, 1882.
Marchal, E., The production of ammonia in the soil by microbes. Agrical. Sciences, Vol. 8, 1894 (zitiert nach Ref. Centralbl. f. Bakt., II. Abt., Bd. 1, 1895).
Marino, L. und Sericano, G., Studio chimico e fisico sulla natura chimica degli enzimi e la loro attività. Atti d. Società Ligustica di Scienze, Vol. 16, 1905.
Matzuschita, T., Ueber die Veränderlichkeit der Eigenschaft des Bacillus anthracis, Gelatine zu verflüssigen. Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Bd. 28, 1900.
Maumus, Sur la transformation de l'amidon végétal en sucre par le bacille du charbon. Compt. rend. de la soc. de biolog., der ganzen Reihe Bd. 45, 1893.
Mavrojanus, A, Das Formol als Mittel zur Erforschung der Gelatineverflüssigung durch die Mikroben. Zeitschr. f. Hyg. Bd. 45, 1903.
Meinicke, Ueber die Haemolysine der choleraähnlichen Vibrionen. Zeitschr. f. Hyg., Bd. 50, 1905.
Meisenheimer siehe Buchner, E.
Mereshkowsky, S., S., Ueber die Einwirkung der Anilinfarben auf Invertin. Centralbl. f. Bakt., II. Abt., Bd. 11, 1903.
Mett, Beiträge zur Physiologie der Absonderungen. Du Bois Archiv f. Physiol., 1894.
Miyamota siehe Friedenthal.
Miquel, P., Die Vergärung des Harnstoffes, der Harnsäure und der Hippursäure. Lafar's Handb. d. techn. Mykologie, Bd. 3, Kap. 3, 1904.
Moll, L., Über Antiurease. Beitr. z. chem. Physiol. und Pathol., Bd. 2, 1902.
Mohr, O., Einfluß der Kohlensäure auf die Diastasewirkung. Zeitschr. f. Spiritusindustrie, Bd. 25.
Montesano siehe Fermi.
Moreschi, C., Diastasi ed antidiastasi proteolytica del V. cholerae. Giorn. d. R. Società Ital. d'Igiene, 1903.
Morris siehe Brown.
Musculus, M., Sur le ferment de l'urée. Compt. rend. de l'Acad. Paris, T. 82, 1876 (und erste Mitt. 1874).
Müller, Friedrich, Ueber reduzierende Eigenschaften der Bakterien. Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Bd. 26, 1899.

Müller-Thurgau, Zur Kenntnis der Wirkung von Diastase und Invertin, besonders in pflanzenphysiologischer Hinsicht. Landwirtsch. Jahrb. 1885.
Nägeli, Die niederen Pilze. 1882.
Neisser, M., und Wechsberg, F., Ueber das Staphylotoxin. Zeitsch. f. Hyg., Bd. 36, 1901.
Nencki, M., Die isomeren Milchsäuren als Erkennungsmittel einzelner Spaltpilzarten. Centralbl. f. Bakt., I. Abt, Bd. 9, 1891.
Nencki, M., und Sieber, N., Über die Bildung der Paramilchsäure durch Gährung des Zuckers. Monatshefte f. Chemie, Wien, Bd. 10, 1889.
Neumann-Wender, Die reduzierenden Enzyme und ihre Beziehungen zur alkolischen Gärung. Österr. Brennereiztg., Jahrg. 3, 1905.
Obermayer, Fr., und Pick, E. Ueber Veränderungen des Brechungsvermögens von Glykosiden und Eiweißkörpern durch Fermente, Säuren und Bakterien. Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol., Bd. 7, 1906.
Oker-Blom, M. Die elektrische Leitfähigkeit und die Gefrierpunktserniedrigung als Indikatoren der Eiweißspaltung. Skand. Archiv f. Physiol., Bd. 13.
Omelianski, W., Ueber die Gärung der Cellulose. Centralbl. f. Bakt., II. Abt., Bd. 8, 1902.
— Die histologischen und chemischen Veränderungen der Leinstengel unter Einwirkung der Mibroben der Pektin- und Cellulosegärung. Centralbl. f. Bakt., II. Abt., Bd. 12, 1904.
— Ueber Trennung der Wasserstoff- und Methangärung der Cellulose. Centralbl. f. Bakt., II. Abt., Bd. 11, 1904.
— Die Cellulosegärung. Lafars Handb. d. techn. Mykologie, Bd. 3, Kap. 9, 1905.
Oppenheimer, C., Die Fermente und ihre Wirkungen. II. Aufl, Leipzig 1903.
Osborne, A., Contribution of the study of Invertin (Invertase). Chem. News, Vol. 79, No. 79.
Oshima, K., Ueber Hefegummi und Invertin. Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. 36, 1902.
O'Sullivan, C., und Tompson, Invertase, a contribution to the history of an enzyme or unorganised ferment. Journ. Chem. Soc. London, Transact. Bd. 57, 1890.
Perdrix, Sur les fermentations produites par un microbe anaérobic (Bacillus amylozyme). Annal. de l'Inst. Pasteur, T. 5, 1891.
Pernossi, siehe Fermi.
Peters, W., Die Organismen des Sauerteiges und ihre Bedeutung für die Brotgärung. Botan. Ztg. 1899.
Pfeffer, W., Ueber regulatorische Bildung von Diastase. Sitzungsber. d. Kgl. Sächs. Akad. 1896.
Pfersdorff siehe Levi, E.
Pick siehe Obermayer.
Preti, L., Über die Existenz und Spezifizität der immunisatorischen Antidiastasen. Biochem. Zeitschr., Bd. 4, 1907.
Pulfrich, Eintauchrefraktometer. Zeitschr. f. angew. Chemie, II, 1899.
Puriewitsch, K., Über die Spaltung der Glukoside durch Schimmelpilze. Ber. d. Deutsch. botan. Gesellsch., Bd. 16, 1898.
Raczyński, N., Zur Frage über die Mikroorganismen des Verdauungskanals. Diss. Russisch. Ref. Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Bd. 6, 1899.
Rahn, O., Die Zersetzung der Fette. Centralbl. f. Bakt., II. Abt., Bd. 15, 1906.
Reber, Ueber Agglutination der Vaginalstreptokokken gravider Frauen und die durch dieselben hervorgerufene Haemolyse. Zeitschr. f. Geburtsh. u. Gynäk., Bd. 54.
Reinmann, R., Untersuchungen über die Ursachen des Ranzigwerdens der Butter. Centralbl. f. Bakt., II. Abt., Bd. 6, 1900.
Reiser siehe Emmerling.
Repetto siehe Fermi.
Roscules siehe Gläsner.
Roszahegyi, Über das Züchten von Bakterien in gefärbter Nährgelatine. Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Bd. 2.
Rothenbach, F., und Eberlein, L, Zu der Enzymgärung der Essigpilze. Deutsche Essigindustrie, Bd. 9.
Rothenberger, Differential-diagnostische Untersuchungen mit gefärbten Nährböden. Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Bd. 24, 25.
Rouge, E. Le Lactarius sanguifluus Fr. et la Lipase. Centralbl. f. Bakt., II. Abt., Bd. 18, 1907.

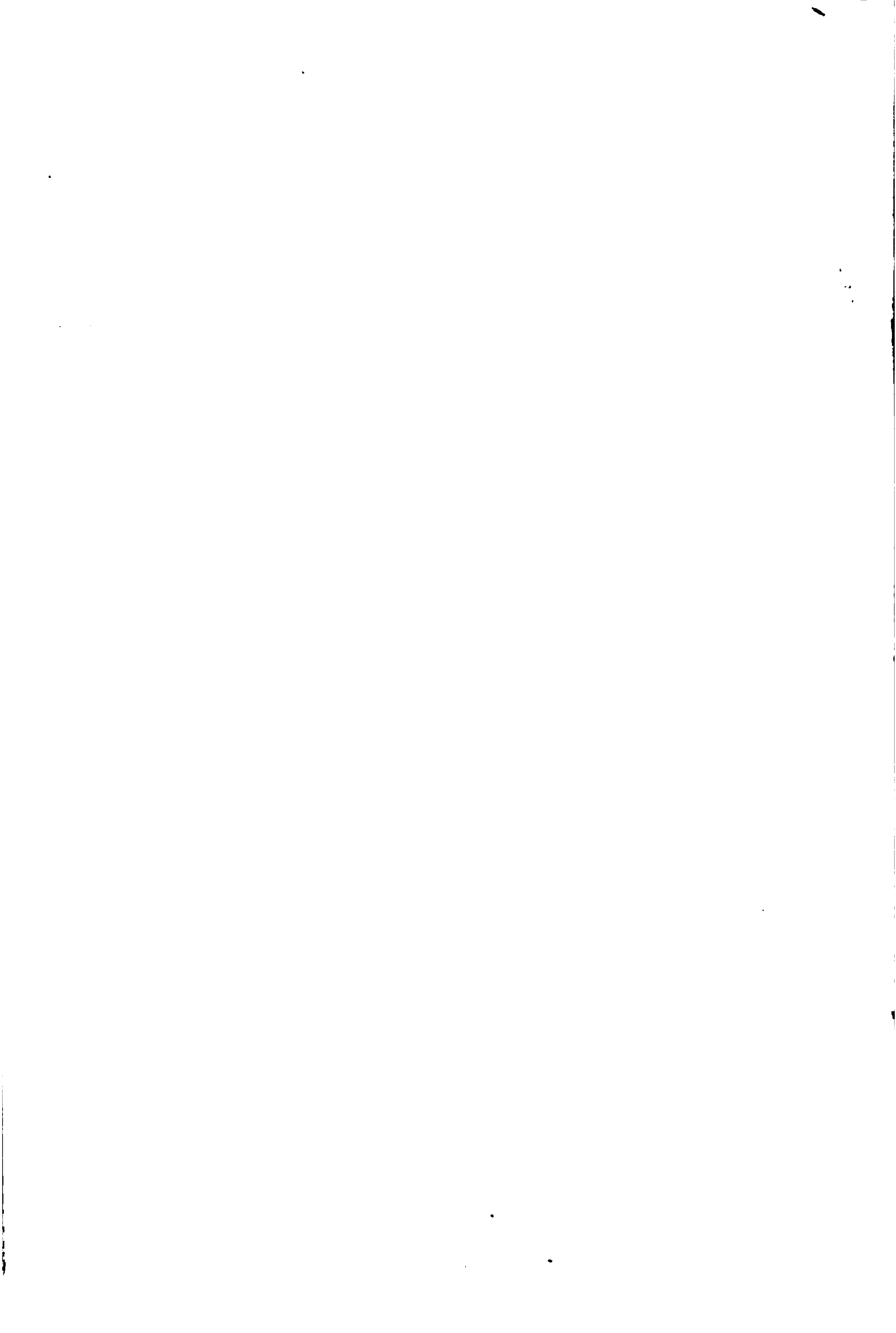
Roux siehe Maquenne.
Rubner, M., Ueber Spaltung und Zersetzung von Fetten und Fettsäuren im Boden und Nährflüssigkeiten. Archiv f. Hyg., Bd. 38, 1900.
Ruediger, The production and nature of streptocolysin. Journ. of Amer. med. Assoc., 1903.
Salkowski, E., Über das eiweißlösende Ferment der Fäulnisbakterien und seine Wirkung auf Fibrin. Zeitschr. f. Biologie, Bd. 25 (neue F. 7), 1889.
— Ueber das „Invertin" der Hefe. Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. 31, 1900.
Sawjalow, W., Zur Theorie der Eiweißverdauung. Diss. Dorpat 1899 und Pflügers Archiv, Bd. 85, 1901.
Schardinger, Fr., Ueber eine neue optisch aktive Modifikation der Milchsäure, durch bakterielle Spaltung des Rohrzuckers erhalten. Monatshefte f. Chemie, Wien, Bd. 11, 1890.
Schattenfroh, A., und Grassberger, R., Weitere Mitteilungen über Buttersäuregärung. Centralbl. f. Bakt., II. Abt., Bd. 5, 1899.
Scheurlen, Die Verwendung der selenigen und tellurigen Säure in der Bakteriologie. Zeitschr. f. Hyg., Bd. 33, 1900.
Schlesinger, A., Experimentelle Untersuchungen über das Haemolysin der Streptokokken. Zeitschr. f. Hyg, Bd. 44, 1903.
Schmidt-Nielson, Die Enzyme, namentlich das Chymosin, Chymosinogen und Antichymosin in ihrem Verhalten zu konzentriertem elektrischen Lichte. Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol., Bd. 5, 1904.
Schoffer, Zur Kenntnis der Milchgerinnung durch Cholerabakterien. Arb. kais. Gesundh. Berlin, Bd. 11.
Schouten, L., S., Eine modifizierte Methode und ein neuer Apparat für Enzymuntersuchung. Centralbl. f. Bakt., II. Abt., Bd. 18, 1907.
Schreiber, K., Fettzersetzung durch Mikroorganismen. Arch. f. Hyg., Bd. 41, 1902.
Schütz, E., Methode zur Bestimmung der relativen Pepsinmenge. Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. 9, 1887.
— Zur Kenntnis der quantitativen Pepsinwirkung. Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. 30, 1900.
— und Huppert, H., Über einige quantitative Verhältnisse bei der Pepsinverdauung. Pflügers Arch., Bd. 80.
Schütze, A., Ueber Antilactase. Zeitschr. f. Hyg., Bd. 48, 1904.
— Ueber einen Antikörper gegen Steapsinsolution. Deutsche med. Wochenschr., Jahrg. 30, 1904.
Schur, H., Ueber Haemolyse. Studien über die Wirkungsweise des Staphylolysins. Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol., Bd. 3, 1903.
Schwoner, J., Über die hämolytische Wirkung des Löffler'schen Bacillus. Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Orig., Bd. 35, 1904.
Sclavo, Roma 1892 (zitiert nach Fermi und Montesano).
Sericano siehe Marino.
Senus, van, A. H. C., Bijdrage tot de kennis der cellulosegistnig. Leiden 1890.
Sheridan Lea, Some notes on the isolation of a soluble urea-ferment from the Torula ureae. Journ. of Physiol., Vol. 11, 1890.
Siegfried, M., Ueber Antipepton. (II Mitteil.) Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. 35.
Sigmund, W., Die physiologischen Wirkungen des Ozons. Centralbl. f. Bakt., II. Abt., Bd. 14, 1905.
Sjöquist, Physiologisch-chemisches über Salzsäure. Skand. Archiv f. Physiol., Bd. 5.
Smith, Reduktionserscheinungen bei Bakterien und ihre Beziehungen zur Bakterienzelle, nebst Bemerkungen über Reduktionserscheinungen in steriler Bouillon. Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Bd. 19, 1896.
Sommaruga, E. von, Ueber Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen. Zeitschr. f. Hyg., Bd. 18, 1890.
Spina, Bakteriologische Versuche mit gefärbten Nährsubstanzen. Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Bd. 2.
Spriggs, On a new methode of observing peptic activity. Journ. of Physiol., Bd. 28, 1902.
Tammann, G., Die Reaktion der ungeformten Fermente. Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. 16, 1892.
Tappeiner siehe Jodlbauer.
Tate, The fermentation of dextrose, rhamnose and mannitol by a levolactic ferment. Journ. chem. Soc. London, Bd. 63, 1893.

Tavernari, L.; Die Pyocyanase Emmerich's und Löw's bei dem experimentellen Milzbrand. Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Orig., Bd. 31, 1902.
Taylor, A. E., Ueber Eiweißspaltung durch Bakterien. Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. 36, 1902.
Tieghem, Van, Ph., Leuconostoc mesenterioides. Annal. de Scienc. nat., Ser. 6, T. 7.
Timpe, Ueber die Beziehungen der Phosphate und des Caseins zur Milchsäuregärung. Arch. f. Hyg., Bd. 18, 1893.
Tissier, H., und Martelly, Recherches sur la putréfaction de la viande de boucherie. Annal. de l'Inst. Pasteur, T. 16, 1902.
Tompson siehe O'Sullivan.
Twort, F. W., The fermentation of glucosides by bacteria of the Typhoid-coli group and the acquisition of new fermenting powers by Bacillus dysenteriae and other micro-organisms. Proceed. of the R. Soc. of London, Ser. B, Vol. 79, No. 532, 1907
Vaerst, Immunisierung gegen Milzbrand mit Pyocyanase und Kombinationen derselben. Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Orig., Bd. 31, 1902.
Vandevelde, A. J. J., Étude sur le mécanisme de virulence du staphylocoque pyogène. La Cellule, T. 10.
— Über die Anwendung von Antiseptiken bei Untersuchungen über Enzyme. Biochem. Zeitschr., Bd. 3, 1907.
— Über Diffusion von Enzymen durch Cellulosemembrane. Biochem. Zeitschr., Bd. 1, 1906.
— siehe Denys.
Vignal, Contribution à l'étude des bactériacées (Schizomycetes). Le bacille mesentericus vulgatus. Paris 1889.
Villiers, A., Sur la fermentation de la fécule par l'action du ferment butyrique. Compt. rend. de l'Acad. Paris, T. 112, 1891.
— Sur la transformation de la fécule en dextrine par le ferment butyrique. Ebendort.
Volk, R., Ueber die Bindung des Bakteriohämolysins an die roten Blutkörperchen. Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Orig., Bd. 34, 1903.
Walker, E., W., The composition of certain normal ferments considered in relation to the constitution of lysins. Proceed. physiol. Soc., Vol. 31, 1905.
Ward, W. und Green, R., A sugar bacterium. Proceed. Royal soc. of London, Vol. 65, 1899.
Warington, R., The chemical actions of some micro-organisms. Rothamsted Laboratory, London 1888
Wassermann, A., Hämolysine, Cytotoxine und Präcipitine. Volkmann's Sammlung klinischer Vorträge, No. 331, Leipzig 1901.
Wechsberg siehe Neisser.
Weigmann, H, Abnormale Erscheinungen an der Milch und ihren Produkten. Lafars Handb. d. techn. Mykologie, Bd. 2, Kap. 11—13, 1906.
Weingeroff, L., Zur Kenntnis des Haemolysins des Bacillus pyocyaneus. Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Bd. 29, 1901.
Weyl siehe Kitasato.
Wolff, A., Zur Reduktionsfähigkeit der Bakterien. Centralbl. für Bakt., I. Abt., Bd. 27, 1900.
Wood, Laboratory Reports, Roy. Coll. Phys., Edinburgh. Vol. 2. (Zitiert nach Green-Windisch, Enzyme.)
Wortmann, Jul., Untersuchungen über das diastatische Ferment der Bakterien. Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. 6, 1882.
Wróblewski, A., Ueber die chemische Beschaffenheit der amylolytischen Fermente. Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch., Bd. 31, 1896.
Wunschheim, Archiv f. Hyg., Bd. 54, 1905.
Wysmann, H. P., De diastase beschouwd als mengsel van Maltase en Dextrinase. Amsterdam 1889.

Sachregister.

Druckfehlerberichtigungen.

Seite 41, Zeile 28 von oben „Schwefelwasserstoff“ statt Schwefelwasser.
„ 41. „ 28 „ „ „typischen“ statt tryptischen.
„ 43. „ 22 „ „ „von denen weitaus die meisten“ statt von denen weitaus die meisten von ihnen.
„ 49. „ 2 „ unten „Zusätze von den übrigen“ statt Zusätze von übrigen.
„ 55 und 69 „Duclaux“ statt Ducleaux.
„ 61, Zeile 7 von oben „ob es“ statt ob er.
„ 63, „ 3 „ unten „Aviditäten“ statt Aziditäten.
„ 72, „ 9 „ „ „Fällung“ statt Flälung.
„ 79, „ 10 „ oben „Ströme“ statt Säure.
„ 85, „ 12 „ unten „Granulobacter“ statt Granulabacter.
„ 86, „ 9 „ „ „dabei zur“ statt dabei er zur.
„ 87, „ 21 „ oben „van Iterson“ statt van Herson.



VORLESUNGEN

ÜBER

BAKTERIENENZYME.

VON

Dr. phil. FRANZ FUHRMANN,

PRIVATDOZENTEN FÜR TECHNISCHE MYKOLOGIE AN DER TECHNISCHEN HOCHSCHULE
UND BAKTERIOLOGIE AN DER UNIVERSITÄT ZU GRAZ.

MIT 9 ABBILDUNGEN
UND 5 GRAPHISCHEN DARSTELLUNGEN IM TEXT.



JENA.
VERLAG VON GUSTAV FISCHER.
1907.

Vorlesungen über Pflanzenphysiologie.

Von Dr. **Ludwig Jost**, a. o. Prof. a. d. Universität Straßburg. Mit 172 Abbildungen. Preis: brosch. 13 M., geb. 15 M.

Flora, 1904, Bd. XCIII, H. 2:

. . . Die Darstellung ist klar, kritisch und reichhaltig und oft durch historische Rückblicke belebt. Die Jost'schen Vorlesungen werden deshalb als eine treffliche Einführung in das Studium der Pflanzenphysiologie begrüßt werden. Auch für Berufsbotaniker ist das Buch wertvoll durch die eingehende Berücksichtigung und Diskussionen, welche die neuere pflanzenphysiologische Literatur in ihm gefunden hat.

Handbuch der Technischen Mykologie.

Dritter Band. **Mykologie des Bodens, des Wassers und des Düngers.** Unter Mitwirkung der Herren Prof. Dr. J. Behrens in Augustenberg, Prof. Dr. M. Hahn in München, Reg.-Rat Dr. L. Hiltner in München, Mag. scient. H. Jensen in Buitenzorg, Prof. Dr. A. Koch in Göttingen, Prof. Dr. R. Kolkwitz in Charlottenburg, Dr. P. Miquel in Paris, Dr. W. Omelianski in St. Petersburg, Dr. A. Reinsch in Altona, Dr. W. Rullmann in München, Dr. A. Spieckermann in Münster i. W., Prof. Dr. C. Freiherr v. Tubeuf in München, Dr. H. Wichmann in Wien, Prof. Dr S. Winogradsky in St. Petersburg. Herausgegeben von Dr. **Franz Lafar,** o. ö. Prof. der Gärungsphysiologie und Bakteriologie an der k. k. Technischen Hochschule zu Wien. Mit 10 Tafeln und 90 Abbildungen im Text. Preis: 18 Mark.

Vierter Band. **Spezielle Morphologie und Physiologie der Hefen und Schimmelpilze.** Unter Mitwirkung der Herren Dr. A. Bau in Bremen, Prof. Dr. M. Hahn in München, Alb. Klöcker in Kopenhagen, Prof. Dr. G. Lindau in Berlin, Prof. Dr. R. Meissner in Weinsberg, Prof. Dr. H. Müller-Thurgau in Wädensweil, Dr. R. Rapp in München, Prof. Dr. C. Wehmer in Hannover, Dr. H. Wichmann in Wien, Prof. Dr. H. Will in München. Herausgegeben von Dr. **Franz Lafar,** o. ö. Prof. der Gärungsphysiologie und Bakteriologie an der k. k. Technischen Hochschule zu Wien. Mit einer Tafel, einer Tabelle und 123 Abbildungen im Text. Preis: 17 Mark.

☞ Das Werk wird in 5 Bänden vollständig. Von den noch nicht abgeschlossenen Bänden I, II und V liegen bereits mehrere Lieferungen vor. ☜

Vorlesungen über Deszendenztheorien

mit besonderer Berücksichtigung der botanischen Seite der Frage, gehalten an der Reichsuniversität zu Leiden. Von Dr. **J. P. Lotsy.** Erster Teil. Mit 2 Tafeln und 124 Textfiguren. Preis: 8 Mark, geb. 9 Mark.

Botanische Zeitung, 1906, Nr. 5:

. . . Für den einzelnen ist schon heute diese ganze Literatur kaum übersehbar, und deshalb ist Lotsys Versuch einer allgemein verständlichen, zusammenfassenden Darstellung mit Freuden zu begrüßen.

Naturwissenschaftliche Wochenschrift. N. F., Bd. V. Nr. 25:

Das Buch Lotsys ist besonders verdienstlich durch die Hervorkehrung der botanischen Tatsachen. Werke, die zur Begründung deszendenztheoretischer Ansichten vorwiegend zoologische Daten benutzen, sind zahlreich, während botanische Deszendenztheorien von dem Umfang der Lotsyschen Schrift noch nicht existieren. Der Botaniker wird dem Verfasser daher besonders Dank wissen.

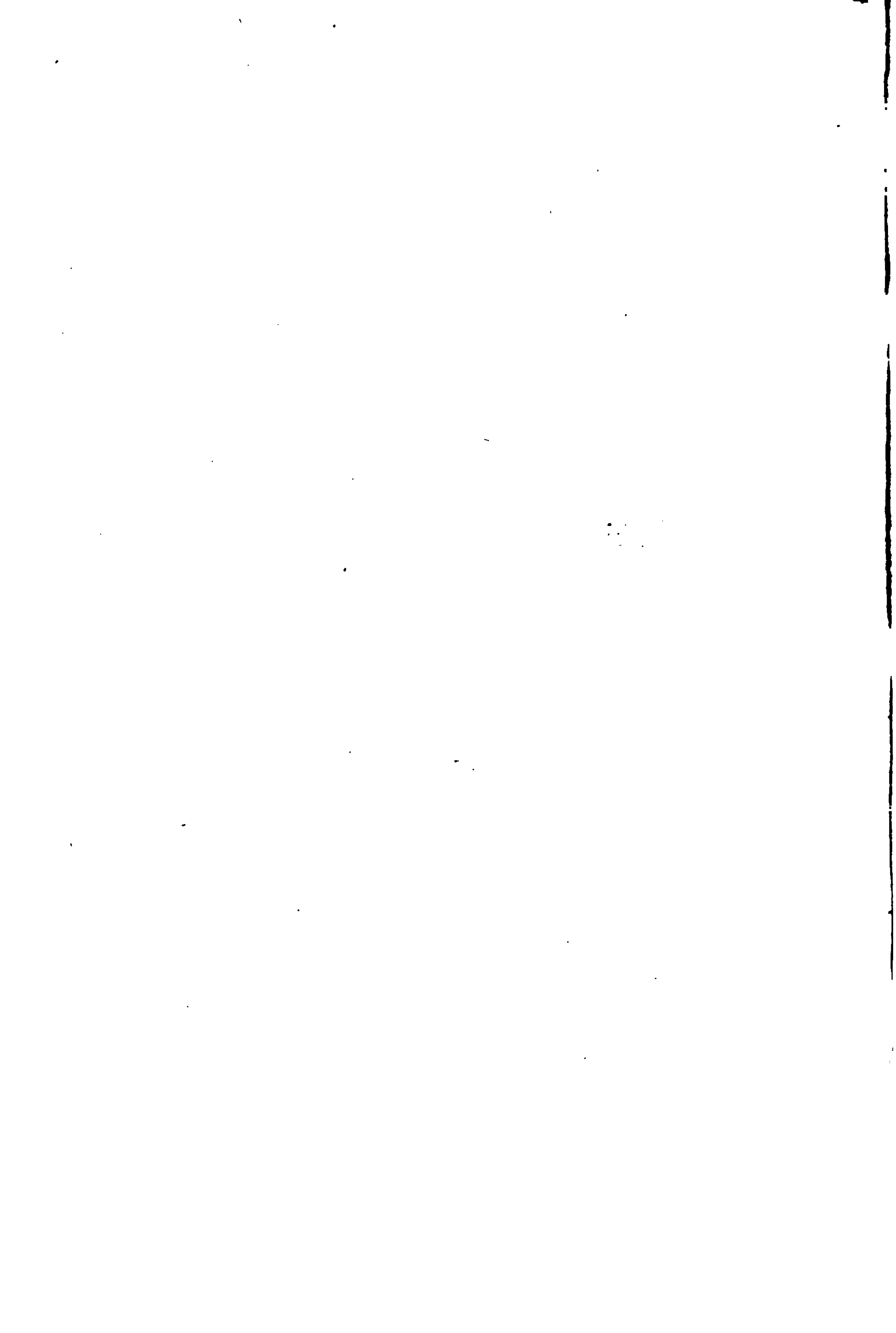
Vorträge über Botanische Stammesgeschichte.

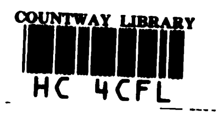
Gehalten an der Reichsuniversität zu Leiden. **Ein Lehrbuch der Pflanzensystematik** von Dr. **J. P. Lotsy.** Erster Band: **Algen und Pilze.** Mit 430 Abbildungen im Text. Preis: 20 Mark.

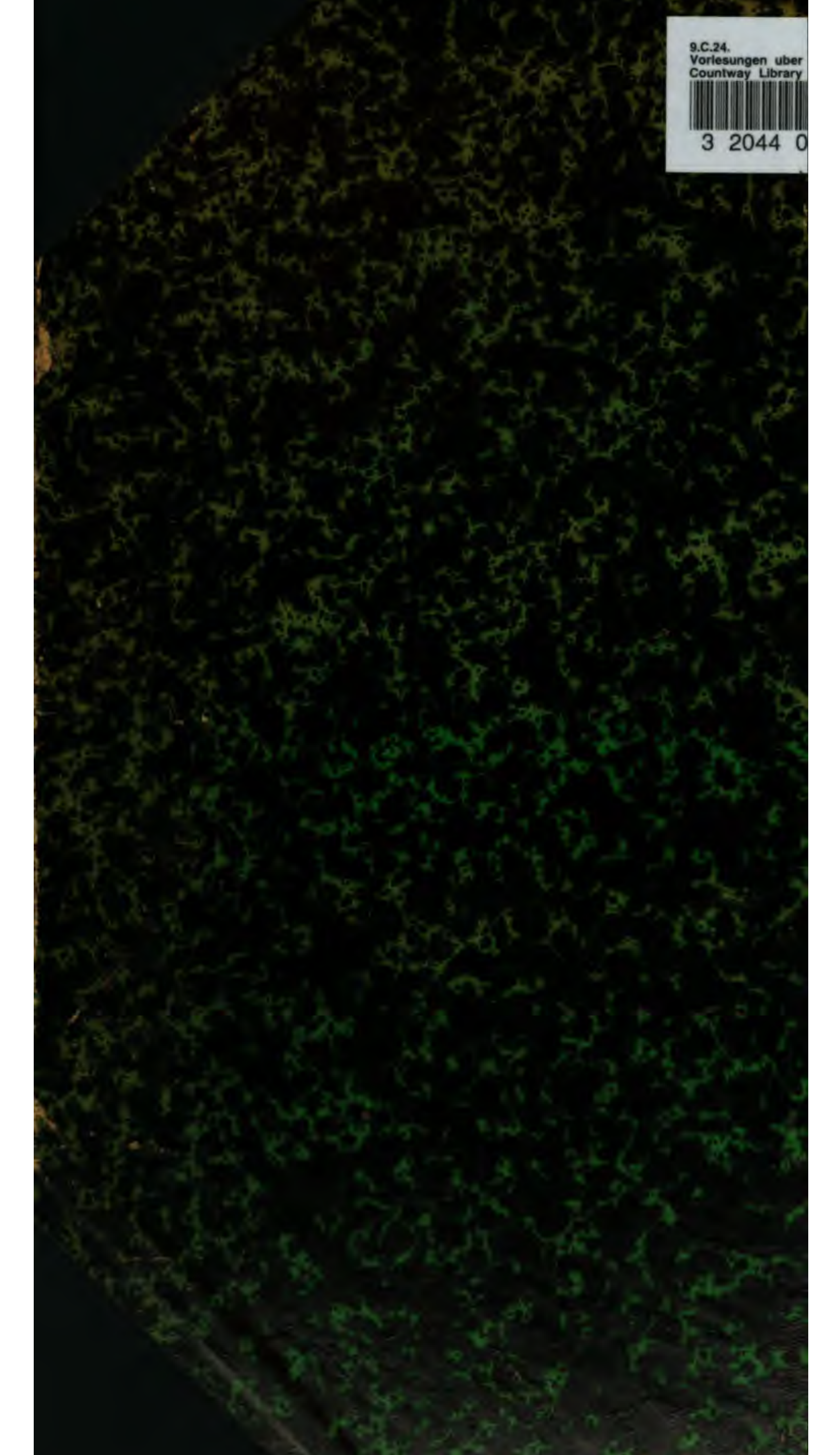
Grundriss einer Histochemie der pflanzlichen Genussmittel.

Von Dr. **Hans Molisch,** Prof. der Botanik und Vorstand des pflanzenphysiolog. Instituts der deutschen Universität Prag. Mit 15 Holzschnitten. Preis: 2 Mark.

Weimar. — Druck von R. Wagner Sohn.







9.C.24.
Vorlesungen uber
Countway Library
3 2044 0